

**Identificación y caracterización de grupos de especies de *Alternaria* y *Pithomyces*
asociados a enfermedades del trigo en Argentina**

*Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae de la Facultad de Ciencias
Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata*

Licenciada en Ciencias Biológicas María Victoria Fernández



Directora

Dra. Ing. Agr. Analía Edith Perelló

Jurados

Ing. Agr. Ángela Norma Formento

Dra. Alicia Luque

Dra. Ing. Agr. María Mercedes Scandiani

Fecha de defensa de la tesis

A determinar

*Lo conocido es limitado, lo desconocido es vasto.
Vayamos hacia lo desconocido más y más.*

B.K.S. Yyengar

Dedicatoria

A los que ya no están conmigo, y me acompañan siempre en el corazón.

Agradecimientos

A la Ing. Agr. Dra. Analía Perelló por su dedicación, profesionalismo, constancia y aporte fundamental a esta tesis.

Al SENASA por permitir a los profesionales del Organismo la capacitación y realización de esta Maestría.

Al Lic. Mario Gomez, Ing. Agr. María Elena Manna e Ing. Agr. M.Sc. Pablo Cortese por permitirme realizar tanto los Cursos de la Maestría como los ensayos de la tesis.

A la Lic. M.Sc. Nora Abiatti por su desinteresada e invaluable colaboración en el tratamiento estadístico de los datos obtenidos.

Al Dr. Sergio Stenglein y la Dra. Virginia Moreno por permitir la realización de los análisis moleculares en el Biolab de Azul.

A la Ing. Agr. M.Sc. Cristina Sandoval por su inapreciable apoyo, colaboración y sugerencias en la redacción de la tesis.

A los responsables de la Red de ensayos comparativos de variedades de trigo (RET) y a las principales semilleros del país que enviaron amablemente las muestras de trigo sin las cuales no se podrían haber realizado los ensayos.

A mis compañeros de trabajo, Ing. Agr. M.Sc. Vanina Sugia, Ing. Agr. Ana Iribarne, Lic. Javier Orzuza, Prof. Susana López, Lic. Juan Bidart y Lic. Lucas Nuñez, los cuales fueron de gran apoyo con sus aportes y acompañamiento en el proceso de redacción.

A mi familia y amigos por su apoyo y compañía en el camino de realización de la Maestría.

RESUMEN

El género *Alternaria* incluye especies fitopatógenas y con potencial para la producción de micotoxinas con implicancias en la agricultura y en la industria alimenticia. Se analizaron 60 muestras de semillas de trigo de 12 localidades trigueras de Argentina y de cinco cultivares de trigo con el objetivo de identificar morfo culturalmente los grupos de especies de *Alternaria* presentes. Luego se seleccionaron 10 aislamientos de cada uno de los grupos de especies presentes: *A. arborescens*, *A. tenuissima*, *A. infectoria* y *A. alternata* para realizar pruebas de patogenicidad en hojas y en semillas de trigo. Un representante de cada grupo de especies fue caracterizado molecular y bioquímicamente. Dos aislamientos de *Pithomyces chartarum*, especie relacionada con *Alternaria*, aisladas a partir de semillas de trigo fueron caracterizadas morfológicamente, y una molecular y bioquímicamente. La caracterización molecular de los aislamientos de los grupos de especies de *Alternaria* y la de *Pithomyces chartarum* confirmaron la identificación morfo cultural. La presencia de los grupos de especies de *Alternaria arborescens*, *A. tenuissima*, *A. infectoria* y *A. alternata* se corroboró en todas las zonas trigueras del país. Los ensayos de patogenicidad demostraron la existencia de aislamientos pertenecientes a todos los grupos de especies de *Alternaria* patógenas en hojas (medido a través de la incidencia e índice de daño). Se comprobó el comportamiento patógeno de *Pithomyces chartarum* en semillas de trigo de los cultivares estudiados. *Pithomyces chartarum* y los grupos de especies de *Alternaria* produjeron en semillas de trigo disminución de la germinación, plántulas debilitadas y necrosis en el coleoptile. En relación a las micotoxinas, los grupos de especies *A. arborescens*, *A. tenuissima* y *A. alternata* produjeron alternariol, alternariol monometil éter, altenueno, altertoxina I y II, tentoxina y ácido tenuazónico. El grupo especie *A. infectoria* produjo altertoxina I y II y tentoxina y *Pithomyces chartarum* produjo alternariol y alternariol monometil éter, no citados previamente.

ABSTRACT

The genus *Alternaria* includes phytopathogenic and mycotoxin producing species with implications for agriculture and food industry. Sixty wheat seed samples from 12 locations in Argentina and five wheat cultivars, were analyzed with the aim of

identifying the *Alternaria* species groups. Four groups of species -*arborescens*, *tenuissima*, *infectoria* and *alternata*- were characterized according morphocultural features. Ten isolates of each one groups were then selected to analyze its pathogenicity by tests on leaves and seeds of wheat. Representative isolates of each species groups were also characterized molecularly to corroborate the morphological determination. Metabolites present in the isolates were analyzed to detect mycotoxin production by biochemical tests. Moreover, two strains of the fungus *Pithomyces chartarum*, an *Alternaria* related species, were also isolated from wheat seeds. Two strains were characterized by morphological characters, and one also with molecular and biochemical analysis. The molecular characterization *Alternaria* species-groups complex and *Pithomyces chartarum* confirmed the morphocultural identification. The presence of *Alternaria arborescens*, *A. tenuissima*, *A. infectoria* and *A. alternata* species-groups in all samples of the wheat areas of Argentina analyzed was confirmed. It showed that there are strains belonging to all groups with pathogenicity on both leaves and seeds of wheat, as measured by the incidence and damage index. It was observed symptoms of rot, reduction in germination of grains, necrosis in coleoptiles and weakening of seedlings emerged from infected grains from both fungi infected grains in artificial inoculation (*Alternaria* species-group and *P. chartarum*). In relation to mycotoxins, the *A. arborescens*, *A. tenuissima* and *A. alternata* groups, produced alternariol, alternariol monomethyl ether, altenuene, altertoxin I and II, tentoxin and tenuazonic acid. The *A. infectoria* group, produced altertoxin and tentoxin I and II and *Pithomyces chartarum* produced alternariol and alternariol monomethyl ether, which were not previously mentioned

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Resumen	iv
Índice de cuadros	ix
Índice de figuras	xi
Índice de apéndices	xiii
Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Situación actual del cultivo de trigo (<i>Triticum</i> spp.) en Argentina	2
1.2 Enfermedades que inciden negativamente en la producción del cultivo	4
1.2.1 Enfermedades de origen micótico	6
1.2.2 Importancia del género <i>Alternaria</i> como hongo patógeno de cultivos	7
1.3 Características del género <i>Alternaria</i> Nees ex Fr	9
1.3.1 Importancia del género <i>Alternaria</i> como hongo patógeno de trigo	12
1.3.2 Géneros cercanos a <i>Alternaria</i> que causan enfermedades en trigo	18
1.4 Micotoxinas producidas por las distintas especies del género <i>Alternaria</i>	20
1.4.1 Micotoxinas producidas por <i>Pithomyces chartarum</i>	22
1.5 Problema planteado	23
1.6 Estado de la cuestión	24
1.7 Hipótesis	25
1.8 Objetivos	25
Capítulo 2: Materiales y Métodos	27
2 Determinación de la presencia de <i>Alternaria</i> en semillas de trigo de diferentes zonas agroecológicas de Argentina	28

2.1	Origen de las semillas de trigo	28
2.2	Caracterización morfofocultural de los aislamientos	29
2.3	Selección de aislamientos de <i>Alternaria</i>	30
2.4	Caracterización molecular de los grupos de aislamientos de <i>Alternaria</i>	32
2.5	Identificación del comportamiento patógeno o saprófito de los aislamientos de <i>Alternaria</i>	35
2.5.1	Pruebas de patogenicidad: inoculación de plantas de trigo en fase de desarrollo Z1.4	36
2.5.2	Pruebas de patogenicidad: inoculación de semillas de trigo	38
2.6	Determinación de los perfiles metabólicos del complejo de especies de <i>Alternaria</i> patógenas del trigo presentes en Argentina	39
2.7	Caracterización morfobiométrica y cultural de los aislamientos de <i>Pithomyces chartarum</i>	41
2.8	Caracterización genética de <i>P. chartarum</i> mediante un análisis molecular	41
2.9	Pruebas de patogenicidad de los aislamientos de <i>P. chartarum</i> mediante inoculaciones en semillas de trigo	42
2.10	Análisis de metabolitos secundarios asociados a <i>P. chartarum</i>	44
	Capítulo 3: Resultados	45
3.1	Determinación de la presencia de los diferentes grupos de <i>Alternaria</i> en semillas de trigo de distintas zonas agroecológicas de Argentina a partir de caracteres morfofoculturales	46
3.2	Caracterización molecular de los grupos de aislamientos determinados previamente a partir de caracteres morfofoculturales	48
3.3	Identificación del comportamiento patógeno de los aislamientos de <i>Alternaria</i>	49
3.3.1	Pruebas de patogenicidad en hojas de trigo	49
3.3.2	Pruebas de patogenicidad en semillas de trigo	60
3.4	Determinación de los perfiles metabólicos del complejo de especies de <i>Alternaria</i> patógenas del trigo presentes en Argentina	63
3.5	Caracterización morfobiométrica y cultural de los aislamientos de <i>Pithomyces chartarum</i>	64

3.6	Caracterización genética mediante un análisis molecular	65
3.7	Análisis de la patogenicidad de los aislamientos de <i>P. chartarum</i> mediante inoculaciones en semillas de trigo	65
3.8	Análisis de metabolitos secundarios asociados a <i>P. chartarum</i>	74
	Capítulo 4: Discusión	75
	Capítulo 5: Conclusiones	86
	Bibliografía	88

ÍNDICE DE CUADROS

1.1	Producción de trigo. Principales productores (en millones de toneladas)	2
1.2	Trigo. Área cosechada (superficie), producción y rendimiento en Argentina	3
1.3	Exportaciones de cereales del año 2014 (enero a septiembre)- en toneladas	4
1.4	Reporte comparativo del comercio exterior de trigo 2013/2014. Primeros 9 meses de cada año	4
1.5	Importancia relativa de las enfermedades foliares del trigo según su difusión e importancia relativa	5
1.6	Importancia relativa de las enfermedades de la espiga del trigo según su difusión e importancia relativa	6
2.1	Aislamientos de referencia utilizados para la caracterización morfo cultural	30
2.2	Identidad y origen geográfico de los aislamientos de <i>Alternaria</i> seleccionados para los ensayos de patogenicidad	31
2.3	Aislamientos de los grupos de especies de <i>Alternaria</i> elegidos para los análisis moleculares	32
2.4	Cultivares de trigo utilizados en los ensayos con <i>Alternaria</i>	36
2.5	Cultivares de trigo utilizados en los ensayos con <i>P. chartarum</i>	42
3.1	Frecuencia de aparición de los distintos grupos de especies de <i>Alternaria</i> por región triguera	48
3.2	Análisis moleculares realizados a un aislamiento de cada grupo de especies de <i>Alternaria</i>	49
3.3	Correlaciones entre las incidencias e índices de daño en 5cv. de trigo inoculados	50
3.4	Contribución de cada componente a la variabilidad total en el Análisis de Componentes Principales (ACP)	51
3.5	Coefficientes que definen los dos primeros componentes principales	51
3.6	Correlaciones entre los componentes principales y las variables originales	52
3.7	Contribución de cada componente a la variabilidad total en el ACP	54
3.8	Coefficientes que definen los dos primeros componentes principales	54
3.9	Correlaciones entre los componentes principales y las variables originales	54
3.10	Contribución de cada componente a la variabilidad total en el ACP	56

3.11	Coeficientes que definen los dos primeros componentes principales	56
3.12	Correlaciones entre los componentes principales y las variables originales	57
3.13	Contribución de cada componente a la variabilidad total en el ACP	60
3.14	Correlaciones entre los componentes principales y las variables originales	61
3.15	Perfiles de producción de metabolitos secundarios de los grupos de especies de <i>Alternaria</i> aislados de semillas de trigo	64
3.16	Análisis moleculares realizados a un aislamiento de <i>P. chartarum</i>	65
3.17	Contribución de cada componente a la variabilidad total en el Análisis de Componentes Principales (ACP)	66
3.18	Estadísticos descriptivos para <i>P. chartarum</i> en relación a la variable semilla germinada para los cultivares de trigo ensayados	69
3.19	Estadísticos descriptivos para <i>P. chartarum</i> en relación a la variable semilla manchada para los cultivares de trigo ensayados	69
3.20	Estadísticos descriptivos para <i>P. chartarum</i> en relación a la variable coleoptile necrosado para los cultivares de trigo ensayados	70
3.21	Estadísticos descriptivos para <i>P. chartarum</i> en relación a la variable plántula debilitada para los cultivares de trigo ensayados	70
3.22	Perfil de producción de metabolitos secundarios de <i>P. chartarum</i> aislado de semillas de trigo	74

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Trigo. Área cosechada (superficie), producción y rendimiento en Argentina	3
1.2	Microfotografía de los conidios de <i>Alternaria</i>	10
1.3	Síntomas producidos por <i>Alternaria</i> en hojas de trigo	12
1.4	Conidios de <i>Alternaria</i> aislados de trigo	12
1.5	Síntomas de escudete negro producido por <i>Alternaria</i> y otros patógenos en semillas de trigo	13
1.6	Esquema de los patrones de esporulación y morfología de conidios de los grupos de especies de <i>Alternaria</i> presentes en trigo	16
1.7	Microfotografía de los patrones de esporulación y conidios de los grupos de especies de <i>Alternaria</i> : <i>A. tenuissima</i> , <i>A. infectoria</i> y <i>A. alternata</i>	17
1.8	Esquema de los conidios de los grupos de especies de <i>Alternaria</i> : <i>A. tenuissima</i> , <i>A. arborescens</i> , <i>A. infectoria</i> y <i>A. alternata</i>	17
1.9	Esquema de <i>P. chartarum</i> : conidios y micelio	18
2.1	Origen de las semillas de trigo analizadas	28
2.2	Esquema de la aleatorización de una bandeja de siembra (multimacetas)	36
3.1	Detalle de las colonias en APZ luego de 7 días de incubación de los grupos de especies de <i>Alternaria</i>	46
3.2	Patrones de esporulación en APZ luego de 7 días de incubación de los grupos de especies de <i>Alternaria</i>	47
3.3	Colonias de 7 días de incubación obtenidos en medio de cultivo DRYES	47
3.4	Biplot de las dos variables analizadas: incidencia e índice de daño en función de los aislamientos de los grupos de especies de <i>Alternaria</i> en los 5 cvs. de trigo	53
3.5	Biplot de la variable incidencia en función de los aislamientos de los grupos de especies de <i>Alternaria</i> en los 5 cvs. de trigo	55
3.6	Biplot de la variable índice de daño en función de los aislamientos de los grupos de especies de <i>Alternaria</i> en los 5 cvs. de trigo	57
3.7	Dendrograma asociado a la incidencia de 40 aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. en hojas de 5 cvs. de trigo	58
3.8	Dendrograma asociado al índice de daño de 40 aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. en hojas de 5 cvs. de trigo	59
3.9	Biplot de las variables analizadas: semilla germinada, semilla manchada, radícula debilitada y acortada, radícula necrosada y coleoptile debilitado y acortado en función	61

de los aislamientos de <i>Alternaria</i> diferenciados según grupos en los 5 cvs. de trigo	
3.10 Biplot de las variables analizadas: semilla germinada, semilla manchada, radícula debilitada y acortada, radícula necrosada y coleoptile debilitado y acortado en función de los 5 cvs. de trigo	62
3.11 Dendrograma asociado a la incidencia de 40 aislamientos de <i>Alternaria</i> spp. en semillas de 5 cvs. de trigo	63
3.12 Colonias y conidios pertenecientes a <i>Pithomyces chartarum</i>	65
3.13 Biplot de las variables analizadas: semilla germinada, semilla manchada, coleoptile necrosado y plántula debilitada en función de los aislamientos de <i>P. chartarum</i> en los 9 cvs. de trigo	67
3.14 Dendrograma de las variables analizadas: semilla germinada, semilla manchada, coleoptile necrosado y plántula debilitada en función de los aislamientos de <i>P. chartarum</i> en los 9 cvs. de trigo	68
3.15 Medias, desvíos estándar y prueba de Tukey en relación a la variable semilla germinada para <i>P. chartarum</i>	71
3.16 Medias y desvíos estándar para ambos aislamientos de <i>P. chartarum</i> y cvs. de trigo para la variable semilla manchada	72
3.17 Medias y desvíos estándar de la variable coleoptile necrosado para ambos aislamientos de <i>P. chartarum</i> y cvs. de trigo	73
3.18 Medias y desvíos estándar de la variable plántula debilitada por <i>P. chartarum</i> y cvs. de trigo	74

ÍNDICE DE APÉNDICES

1. Medios de cultivo utilizados	102
2. Protocolo de extracción y purificación de ADN	104
3. Secuencias nucleotídicas de los fragmentos de ADN identificados	106
4. Análisis estadísticos complementarios para <i>P. chartarum</i>	115

Capítulo 1
INTRODUCCIÓN

1.1 Situación actual del cultivo de trigo (*Triticum* spp.) en Argentina

El trigo es una planta monocotiledónea, perteneciente a la Familia Poaceae que produce granos alimenticios. Este cereal ha sido ampliamente cultivado en todo el mundo y constituye el alimento básico de gran parte de la población mundial. Anualmente se producen aproximadamente 700 millones de toneladas en el mundo. Argentina se encuentra entre los principales países productores, y se ubica entre los 15 primeros según la Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (FAO) en relación a la producción de trigo durante el período 2010-2012 (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1: Producción de trigo: Principales productores (millones de toneladas).

	Promedio 2010-12	2011	2012 estim.	2013 pronóst.	Variación: 2013 respecto de 2012 (%)
1 UE	135.2	137.6	132.0	138.0	4.5
2 China Continental	117.7	117.4	120.6	121.4	0.7
3 India	87.5	86.9	94.9	92.3	-2.7
4 Estados Unidos	58.8	54.4	61.8	58.0	-6.1
5 Fed. de Rusia	45.2	56.2	38.0	53.0	39.5
6 Australia	26.5	29.9	22.1	23.0	4.1
7 Canadá	25.3	25.3	27.2	28.0	2.9
8 Pakistán	23.9	24.3	24.0	24.7	2.9
9 Turquía	20.5	21.8	20.1	20.5	2.0
10 Ucrania	18.3	22.3	15.8	19.5	23.4
11 Kazajistán	14.3	22.7	10.3	15.2	47.6
12 Irán (Rep. Islámica del)	14.1	13.5	13.8	13.5	-2.2
13 Argentina	13.4	14.1	10.1	12.5	23.8
14 Egipto	8.1	8.4	8.7	8.5	-2.3
15 Uzbekistán	6.6	6.3	6.7	6.5	-3.0
Total mundial	672.5	700.2	661.8	690.0	4.3

Fuente: FAO. Perspectivas de cosechas y situación alimentaria. N° 1 marzo 2013.
<http://www.fao.org/3/a-al998s.pdf>. Consultado el 12/10/14.

En Argentina, el trigo es uno de los principales cultivos invernales y quizás el grano más antiguo. En nuestro país se producen principalmente dos tipos de trigo:

mayoritariamente trigo pan (*Triticum aestivum* L.), en un 98,5% y el trigo duro o fideo (*Triticum durum* Desf.) contribuye con un 1,5% a la producción.

Según estadísticas de la FAO hechas a partir de datos oficiales, la Argentina posee al año 2013 un área cosechada de más de tres millones de hectáreas, produciendo aproximadamente 8 millones de toneladas, alcanzando un rendimiento de 25378 Hg/Ha. Los datos correspondientes al trienio 2011 – 2013 están ilustrados en el Cuadro 1.2 y la Figura 1.1.

Cuadro 1.2: Trigo. Área cosechada (superficie), producción y rendimiento en Argentina

Año	Superficie (Ha)	Producción (Tn)	Rendimiento (Hg/Ha)
2013	3162138	8024995	25378
2012	3019403	8197855	27151
2011	4494278	14500517	32264

Fuente: FAOSTAT | © FAO Statistics Division 2014 | 05 November 2014 faostat.fao.org.

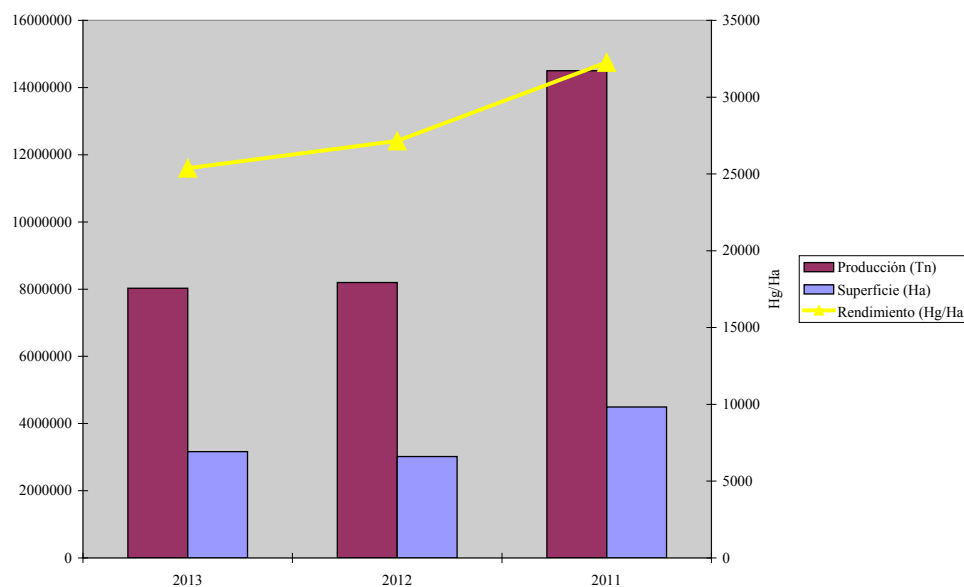


Figura 1.1: Trigo. Área cosechada (superficie), producción y rendimiento en Argentina

Fuente: FAOSTAT | © FAO Statistics Division 2014 | 05 November 2014 faostat.fao.org.

En relación al comercio exterior de cereales, según estadísticas oficiales del SENASA en el período enero a septiembre de 2014, el trigo ocupa el tercer lugar con 1.534.843 tn

exportadas, luego del maíz y la cebada, en primer y segundo lugar respectivamente (Cuadro 1.3).

Cuadro1.3: Exportaciones de cereales del año 2014 (enero a septiembre), en toneladas.

Orden	Especie/Producto	TOTAL	
	Subproducto	17.641.458	%
1	Maíz	11.730.768	66
2	Cebada	2.967.633	17
3	Trigo	1.534.843	9
4	Sorgo	828.484	5
5	Arroz	426.832	2

Fuente: SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria), 2014.

En el mismo período anteriormente mencionado, el principal importador de trigo argentino fue Brasil con un 94 % del total (Cuadro 1.4.).

Cuadro 1.4: Reporte comparativo del comercio exterior de trigo 2013/2014. Primeros nueve meses de cada año.

Trigo	2013	2014
	Tn	Tn
Total	2.604.313	1.534.841
Brasil	2.109.759	1.448.575
Perú	132.573	171
Colombia	80.421	1.386
Venezuela	-	49.919
Tanzania	30.750	-
Sudáfrica	25.763	-
Otros(as)	225.046	34.790

Fuente: SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria), 2014.

1.2 Enfermedades que inciden negativamente en la producción del cultivo

En Argentina el cultivo de trigo es susceptible, en todas sus etapas de crecimiento, al ataque de una gran cantidad de agentes fitopatógenos que pueden causar distintas enfermedades. La ocurrencia de una enfermedad en particular y la magnitud del daño

provocado dependerá tanto del medio ambiente (si se dan o no las condiciones favorables para el desarrollo de determinado patógeno), del cultivar de trigo (si el mismo es resistente, tolerante o susceptible al patógeno), del tipo de patógeno (que incluye su virulencia) y de la presencia o no, de vectores asociados.

Los distintos agentes fitopatógenos pueden provocar enfermedades, y por consiguiente una disminución de la cosecha, así como una merma de la calidad de la misma, siendo ésto una de las principales limitantes en la potencialidad de la producción y el rendimiento del cultivo de trigo.

El Atlas Fitopatológico Argentino cita para *Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum* 70 especies de microorganismos como agentes causales de enfermedades en trigo en Argentina, incluyendo hongos, Oomycetes, bacterias y virus (Perelló *et al.* 2013).

Las enfermedades foliares, junto a las de la espiga, están entre las que provocan un mayor impacto en la productividad. Cordo (2014) presenta una revisión realizada de las principales enfermedades foliares y de la espiga del trigo (Cuadros 1.5 y 1.6).

Cuadro 1.5: Importancia relativa de las enfermedades foliares del trigo según su difusión e importancia relativa

Enfermedad	Agente causal	Etiología	Difusión	Frecuencia de aparición	Nivel de desarrollo de síntomas	Efecto sobre rendimientos
Enanismo amarillo	<i>Barley yellow dwarf virus</i> (BYDV)	Virus	amplia	moderada	moderado/ bajo	moderado/ bajo
Estriado bacteriano	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	Bacteria	limitada	baja	moderado/ bajo	moderado/ bajo
Roya de la hoja	<i>Puccinia recondita</i>	Hongo	amplia	moderada/ baja	moderado/ bajo	importante/ moderado
Mancha amarilla	<i>Drechslera tritici-repentis</i>	Hongo	amplia	alta	moderado/ alto	moderado/ importante
Septoriosis de la hoja	<i>Septoria tritici</i>	Hongo	amplia	moderada	moderado/ bajo	moderado/ importante

Cuadro 1.6: Importancia relativa de las enfermedades de la espiga del trigo según su difusión e importancia relativa

Enfermedad	Agente causal	Etiología	Difusión	Frecuencia de aparición	Nivel de desarrollo de síntomas	Efecto sobre rendimientos
Fusariosis de la espiga	<i>Fusarium graminearum</i>	Hongo	amplia	moderada	moderado/severo	importante
Estriado bacteriano	<i>Xanthomonas translucens</i> pv. <i>undulosa</i>	Bacteria	limitada	baja	moderado/bajo	moderado/bajo
Carbón volador	<i>Ustilago tritici</i>	Hongo	amplia	moderada	leve	bajo
Caries	<i>Tilletia laevis</i>	Hongo	amplia	baja	moderado/severo	moderado/importante

1.2.1 Enfermedades de origen micótico

Los hongos infectan los tejidos de los distintos órganos de las plantas de trigo a través de heridas y aberturas naturales o por penetración directa a través de la epidermis del hospedante. Las infecciones más frecuentes se reconocen por podredumbres húmedas o secas, deformaciones, manchas, pústulas, masas carbonosas y eflorescencias. Estos síntomas son el resultado del agotamiento de los nutrientes presentes en el hospedante, la producción de toxinas o productos de estimulación del crecimiento y la ruptura enzimática del mismo tejido hospedante (Cordo, 2014).

Las enfermedades fúngicas se encuentran entre las más importantes en el cultivo de trigo ya que la mayoría de los patógenos que lo afectan son hongos y Oomycetes.

Annone (2006), con una línea imaginaria que corte la provincia de Buenos Aires de Este a Oeste a la altura de los partidos de Castelli, Las Flores, Gral. Alvear, Bolívar y Trenque Lauquen, define las que, por convención, se han denominado regiones productoras Norte y Sur. Los escenarios sanitarios más frecuentes en esas dos regiones presentan diferencias sustanciales, no sólo en las enfermedades más frecuentes sino también en los niveles de desarrollo epidémico. De integrar los valores medios de prevalencia, intensidad de síntomas y efecto potencial sobre los rendimientos, las enfermedades de mayor importancia relativa para la región Norte son la “roya de la hoja” ocasionada por *Puccinia recondita* (syn. *Puccinia triticina* = *Puccinia recondita* f.sp. *trititina*), la “mancha amarilla” producida por *Drechslera tritici-repentis* y “la fusariosis de la espiga” ocasionada por

Fusarium graminearum. En tanto que para la región Sur, son la “septoriosis de la hoja” producida por *Septoria tritici*, la “roya de la hoja” causada por *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* y el “pietín” ocasionado por *Gaeumannomyces graminis*.

Entre las enfermedades fúngicas que afectan a la espiga y la semilla se destacan la “fusariosis de la espiga” del trigo causada por *Fusarium graminearum*, el manchado de la semilla/grano de trigo (producido por el complejo fúngico conformado por los géneros *Alternaria* spp., *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp, *Drechslera* spp., *Exserohilum* spp., siendo las especies *A. alternata* y *B. sorokiniana* las que han sido aisladas en mayor frecuencia) y los carbones del trigo: carbón cubierto (*Tilletia laevis*, *T. tritici*), carbón desnudo (*T. controversa*), y carbón volador *Ustilago nuda* f.sp. *tritici* Schaffnit (syn. *U. tritici*) (Carmona, 2005).

Los patógenos fúngicos que atacan a la plántula y al sistema radical son *Fusarium* spp., *Bipolaris sorokiniana* (Lori & Sisterna 2014), *Gaeumannomyces graminis*, *Pythium* spp. y *Rhizoctonia* spp. (Wolcan 2014).

Las enfermedades fúngicas que afectan hojas y tallos incluyen la mancha amarilla del trigo (*Drechslera tritici-repentis*), la mancha borrosa del trigo (*Bipolaris sorokiniana*), la septoriosis del trigo (*Septoria tritici*), las royas del trigo (*Puccinia triticina* (Syn. *P. recondita*), *P. striiformis* y *P. graminis*) y el oídio de trigo (*Blumeria graminis*) según Carmona (2005).

A las enfermedades antes citadas para el cultivo de trigo en Argentina se suman las denominadas “enfermedades nuevas o emergentes” como las ocasionadas por *Ascochyta hordei* var. *europaea*, causante de manchas foliares, *Phoma sorghina*, el brusone o quemado (producido por *Pyricularia grisea*), el rayado por *Cephalosporium* (*C. graminis*), los tizones y manchas causados por el complejo de especies de *Alternaria* (Perelló 2014).

1.2.2 Importancia del género *Alternaria* como hongo patógeno de cultivos

Las especies del género *Alternaria* son tanto parásitas de plantas como saprófitas en sustratos orgánicos, éstas últimas están involucradas en la degradación de material vegetal.

Muchas de las especies de *Alternaria* patógenas están citadas en casi todos los países del mundo, mientras que la presencia de otras está restringida a áreas específicas. Ejemplos de especies de distribución cosmopolita son *A. solani* en papa y tomate (Rotem 1994), *A. dauci* en zanahoria (Hernández-Castillo *et al.* 2006, Strandberg 1977), *A. brassicae* (Nowicki *et al.* 2012) y *A. brassicicola* (Gaetán & Madia 1998, Cramer *et al.* 2006, Nowicki *et al.* 2012, Formento, Á.N. 2013, Formento, Á.N., 2014) en Brasicáceas, entre otras.

La mera presencia de especies de *Alternaria* patógenas en varias partes del mundo no indica su impacto económico o agrícola en determinada área. Las citas frecuentemente no consideran la intensidad de enfermedad y daño, y, por consiguiente, aparecen citados en el mismo nivel, países con brotes esporádicos de enfermedad, sin importancia económica, como países que sufren epidemias devastadoras.

Muchos de los hospedantes del género *Alternaria* son susceptibles a sus respectivas enfermedades en dos estadios de su desarrollo. El primer pico de susceptibilidad ocurre en el estadio juvenil. De hecho Neergard (1977) listó todas las especies de *Alternaria* que son transmitidas por semilla, alterando la germinación normal de la misma y causando damping-off. El segundo momento de susceptibilidad se da en el estadio senescente. La susceptibilidad de las hojas o plantas envejecidas ha sido reportada en casi todos los sistemas de *Alternaria*-hospedante (Rotem 1994). También existe una predisposición a la enfermedad en presencia de heridas. Estas heridas locales producirán un aumento de la infección de todas las especies de *Alternaria* patógenas, aunque esta influencia es más crítica en patógenos débiles (Rotem 1994).

Por las características de este segundo momento de susceptibilidad, el aumento en la intensidad de la epidemia en las enfermedades causadas por especies de *Alternaria* fitopatógenas generalmente ocurre cuando parte del rendimiento ha sido producido. Por ello, la pérdida de rendimiento causada por enfermedades producidas por *Alternaria* será generalmente menor a las pérdidas causadas por otros patógenos que dañan al mismo hospedante en un estadio más temprano de crecimiento (Rotem 1994).

Muchas de las enfermedades causadas por especies del género *Alternaria* son comunes y cosmopolitas. Existen hospedantes importantes, que incluyen una variedad de

cultivos, como las brasicáceas (*A. brassicae*, *A. brassicicola* y *A. japonica*), zanahoria (*A. dauci*), papa (*A. solani*), tomate (*A. solani*), girasol (*A. helianthi*),), cítricos (*A. citri*, *A. limicola*, *A. alternata*), cereales, entre ellos el trigo, girasol (*A. helianthi*), maíz (*A. tenuis*), manzano (*A. mali*), papa (*A. solani*), tomate (*A. solani*), zanahoria (*A. dauci*), además de muchas plantas ornamentales y numerosas malezas.

La ausencia de registros de una cierta especie en alguna parte del mundo puede ser debida a un ambiente inadecuado, a la ausencia de hospedantes compatibles o a la insuficiente investigación en ciertos patosistemas en la región o país en cuestión. Esto podría extrapolarse a la situación actual del patosistema *Alternaria*/trigo en Argentina.

1.3 Características del género *Alternaria* Nees ex Fr

El género *Alternaria* fue descrito por primera vez en 1817 por Nees. Es un hongo perteneciente al grupo de los Hyphomycetes dematiáceos, cuyos conidios pigmentados y septados de modo muriforme se desarrollan sobre el ápice de conidióforos característicos. (Simmons 2007). (Figura 1.2). Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Pezizomycotina

Clase: Dothideomycetes

SubClase: Pleosporomycetidae

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

Género: *Alternaria*

Fuente: MycoBank 2015, Indexfungorum 2015.

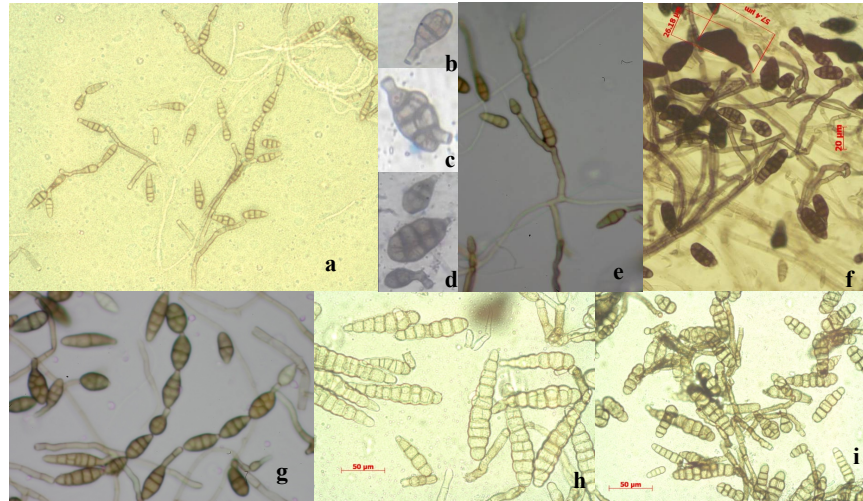


Figura 1.2: Microfotografía de los conidios de *Alternaria*. (Magnificación 400x). a,e: *A. infectoria*, b,c,d: *A. alternata*, f: *A. triticina*, g: *A. tenuissima*, h: *A. brassicae*, i: *A. brassicicola*.

La identificación de especies dentro del género *Alternaria* es compleja ya que a diferencia de otros géneros de Hyphomycetes, *Alternaria* no ha sido sujeto a una revisión taxonómica integral y el género no se ha discutido hasta el momento en coloquios internacionales.

Existen extensos y valiosos trabajos desde comienzos del siglo XX, como los de Elliot (1917), Neergard (1945), Joly (1964), Ellis (1971, 1976), Rotem (1994) y Simmons (1967, 1971, 1981, 1982, 1986, 1990, 1992, 1994, 1995, 2007) sobre la caracterización del hongo (Simmons 2007).

La identificación de especies del género *Alternaria* y su división en grupos de especies se realiza atendiendo características morfológicas y producción de metabolitos secundarios (Andersen *et al.* 2001, 2002, 2009; Pryor & Bigelow 2003) y también mediante análisis filogenético basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Pavón 2010, 2012b), ADN polimórfico detectado al azar (RAPD, rapid amplified polymorphic DNA) (Roberts *et al.* 2000), la técnica de polimorfismo en el largo de los fragmentos amplificados (AFLP, amplified fragment length polymorphism) (Gannibal *et al.* 2007), o mediante la secuenciación de determinados marcadores genéticos.

Simmons & Roberts (1993) concluyen que las especies de *Alternaria* de esporas pequeñas que forman cadenas, esporulan en patrones distintivos y discernibles. La apariencia de cada patrón de esporulación, usualmente visible a 50X de aumento en placa de cultivo, está definida por el conidióforo primario (largo, ramificación, proliferación

lineal), los conidios (tamaño, forma, intensidad de color), las cadenas (número de conidios, ausencia o presencia de ramificaciones) y los conidióforos secundarios interconidiales (largo, proliferación lineal, patrón de ramificación). Los cultivos de una semana en agar papa zanahoria (APZ), en general, presentan una población que, en relación a sus estructuras de esporulación, alcanzó al estado de desarrollo representativo del grupo. Si transcurre un tiempo mayor el sobrecrecimiento aéreo obstaculiza la identificación.

Simmons (2007) propone una clasificación taxonómica que resulte en un método útil de caracterización según grupos de especies, que exhiben patrones similares tanto esporulación como de morfología conidial. Aunque estos grupos no llegan a nivel de identificación de especies, ha sido probada su utilidad para caracterizar aislamientos y agruparlos para subsiguientes pasos de identificación. Dentro de la comunidad científica internacional se considera este trabajo de Simmons como emblemático y referente para determinaciones taxonómicas del género.

En la actualidad además del acercamiento taxonómico tradicional de Simmons (*op. cit.*) existen varios investigadores contemporáneos que con otros enfoques contribuyen a la clasificación dentro del género *Alternaria*, tales como los estudios de Roberts *et al.* (2000) que enfatizan el carácter fitopatógeno y combinan técnicas morfológicas y moleculares. Andersen & Thrane (1996) y Andersen *et al.* (2002) realizaron una clasificación con énfasis en metabolitos secundarios; por su parte, De Hoog & Horré (2002) proponen una clasificación aplicada también a aspectos de medicina humana. En tanto el enfoque filogenético ha sido el elegido por Pryor & Gilbertson (2000) y Pryor & Bigelow (2003).

En relación a las técnicas moleculares, actualmente son un requerimiento esencial para la exitosa identificación de microorganismos cuya caracterización sólo por rasgos morfoculturales es confusa, como es el caso de las especies de *Alternaria* en estudio. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la elección de los marcadores genéticos adecuados para corroborar un diagnóstico previo con un alto grado de especificidad. Entre los marcadores genéticos empleados para *Alternaria*, se destacan los espaciadores internos de la transcripción, ITS1 e ITS2 (Chou & Wu 2002; Konstantinouva *et al.* 2002; Zur *et al.* 2002; Andersen *et al.* 2009), el gen que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gdp) (Pryor & Bigelow 2003), genes que codifican para la síntesis de micotoxinas (Andersen *et al.*, 2006) y el gen Alt a 1 que codifica al principal alérgeno

producido por *A. alternata* y que presenta genes homólogos descritos en otras especies del género *Alternaria* (Hong *et al.* 2005).

En Argentina, existen antecedentes del estudio comparativo de patrones isoenzimáticos de *Alternaria infectoria* asociados al cultivo de trigo (Perelló *et al.* 2003). Recientes estudios quimiotaxonómicos (utilizando el perfil de metabolitos secundarios) se suman al intento de contribuir a la caracterización y diferenciación de especies de *Alternaria* de esporas pequeñas (*A. alternata* y *A. tenuissima*) (Benavidez *et al.* 2011).

1.3.1 Importancia del género *Alternaria* como hongo patógeno de trigo

De los grupos de especies dentro del género *Alternaria* definidos por Simmons (2007), existen cuatro de ellos asociados al trigo en Argentina: *A. infectoria*, *A. alternata*, *A. tenuissima* y *A. arborescens* (Perelló & Larrán 2013). Estos mismos grupos se aíslan con frecuencia en otras áreas productoras de trigo (Andersen *et al.* 2002, 2009, Masková *et al.* 2012) (Figuras 1.3 y 1.4).



Figura 1.3: Síntomas producidos por *Alternaria* en hojas de trigo.

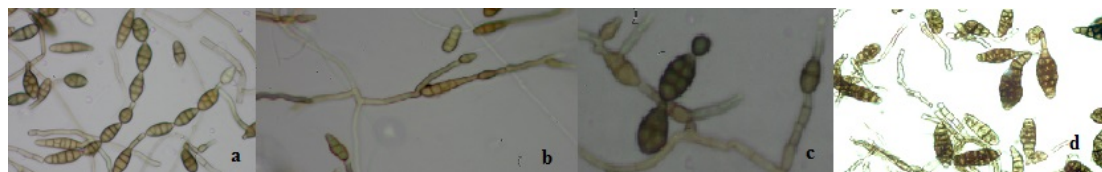


Figura 1.4: Conidios de *Alternaria* aislados de trigo. a *A. tenuissima*, b *A. infectoria*, c *A. alternata*, d *A. trititica*.

En semillas, el escudete negro (“black point”) es un problema de aparición frecuente en la mayoría de las regiones trigueras del mundo (Mathur & Cunfer 1993) y en Argentina (Broggi *et al.* 2007). Se caracteriza por la presencia de una coloración parda o negra en la zona del germen de la semilla de trigo (Figura 1.5) que, en casos severos, puede extenderse al área circundante y al surco (Conner & Davidson 1988). Tradicionalmente, se ha asociado su ocurrencia con la infección de organismos tales como *Bipolaris sorokiniana* y *Alternaria alternata*, entre otros hongos (Mathur & Cunfer 1993). Cabe destacar que ya desde los años '50 *A. alternata* se reporta como el hongo subepidérmico más común de la semilla de trigo, en coincidencia con resultados más recientes de Argentina (Broggi *et al.* 2007).



Figura 1.5: Síntomas de escudete negro producido por *Alternaria* y otros patógenos en semillas de trigo (fila de arriba) versus semillas sanas (fila de abajo).

En Argentina, si bien el grupo *alternata* es descripto como mayoritario, muchas especies podrían haber sido confundidas y erróneamente incluidas en el grupo, o bien tratarse de nuevos miembros taxonómicos de reciente aparición en el área agroecológica triguera de Argentina.

El grupo de *A. alternata* comprende especies con conidióforo primario suberecto, conidios pequeños en grupos de cadenas ramificación libre, los conidióforos secundarios intercalares generalmente son cortos e inconspicuos. El aspecto dominante de la arquitectura de la colonia es denso (Simmons 2007) (Figuras 1.6, 1.7 y 1.8).

Se ha señalado, además, un considerable deterioro en la calidad visual de la pasta, vinculado al aumento en la cantidad de puntos negros en las sémolas producto de la molienda de granos enfermos (Dexter & Matsuo 1982). Durante las últimas campañas, las industrias semolera y fideera de nuestro país han alertado sobre la presencia de niveles

excesivamente altos de grano con escudete negro. Sin embargo, se carece de información actualizada acerca de la composición de especies de *Alternaria* imperantes en las diferentes áreas de producción triguera de Argentina, con la sospecha de que otras, diferentes de *A. alternata*, estarían presentes e involucradas en la producción de “black point” en los cultivares de trigo actualmente en producción (Perelló *et al.* 2008a, Patriarca *et al.* 2006).

En trigo, algunas especies de *Alternaria* tales como *A. triticina* Prasada & Prabhu ocasionan tizones severos en las hojas y manchado de las semillas en espigas, con pérdidas del rendimiento de hasta un 60 % bajo condiciones favorables a la infección y desarrollo de la enfermedad (Anahosur 1978, Zillinsky 1983, Nema 1986, Singh *et al.* 1998). Esta especie fue citada por primera vez en nuestro país en 1992 (Perelló *et al.* 1992). En los últimos años, los relevamientos efectuados sobre diferentes cultivares y regiones ecológicas trigueras, indican que el manchado por *Alternaria triticina* sigue presente (Alberione *et al.* 2010) constituyéndose en una nueva adversidad para el cultivo de este cereal que necesita ser investigada especialmente dado su estatus de enfermedad cuarentenaria para países importadores de trigo procedente de Argentina y que limitaría el ingreso del grano de trigo a nuevos mercados (Perelló *et al.* 2005b, Perelló & Sisterna 2006).

Otros aislamientos de *Alternaria* obtenidos recientemente en muestras de las últimas campañas trigueras fueron coincidentes con la descripción morfobiométrica de los miembros del grupo de especies de *Alternaria infectoria* que constituirían nuevos taxones para Argentina (Perelló & Larrán 2013). El teleomorfo de *Alternaria*, correspondiente a un hongo Dothideomycete del género *Lewia* Barr. & Simmons, ha sido identificado en cultivos in vitro y en rastrojo de trigo a campo, en conexión con el anamorfo (Perelló & Sisterna 2008b). Esto tendría implicancias epidemiológicas y podría explicar en parte la gran variabilidad del hongo.

Por su parte, el grupo *A. infectoria*, se caracteriza por los conidióforos secundarios conspicuos y elongados, con varios lóculos conidiógenos, determinantes de una arquitectura abierta y ramificada (Simmons 2007). Diferentes miembros del grupo *infectoria* se identificaron asociados al manchado foliar y de la semilla de trigo en relevamientos y muestreos realizados en diferentes zonas trigueras (Perelló *et al.* 1996, 2002, 2005a, 2008a). (Figuras 1.6, 1.7 y 1.8).

Los estudios realizados por Christensen *et al.* (2005) mostraron que el grupo *infectoria* comprende las especies *A. arbusti*, *A. infectoria*, *A. oregonensis*, *A. triticimaculans*, *A. metachromatica*, *A. viburni*, *A. intercepta*, *A. novae-zelandiae* y *A. conjuncta*, más varios taxa aún desconocidos. Además, los estudios moleculares más recientes demostraron que *A. triticina* pertenece genéticamente al grupo de especies de “*infectoria*” (Xue & Zhang 2007; Andersen *et al.* 2009). En Argentina, *A. triticimaculans*, *A. infectoria* y *A. triticina* eran las especies del grupo identificadas hasta el año 2010 como patógenas del trigo (Perelló & Sisterna 2008b, Perelló 2010a, Perelló 2010b). Un caracter importante para la identificación de este grupo de especies, es que tanto *A. infectoria* y los miembros del grupo, producen colonias blancas en el medio Agar diclorán rosa de bengala sacarosa y extracto de levadura (DRYES) según Frisvald 1983 y Andersen *et al.* 2002. (Apéndice 1).

González *et al.* (1996) revelan que durante un monitoreo realizado en 1993, utilizando 44 muestras de granos de trigo de las regiones trigueras II y V, aislaron *Fusarium graminearum* como hongo predominante, seguido por *A. alternata* como segundo más frecuente. Entre otros hongos, se aisló *A. tenuissima* en menor porcentaje. No se probó en este estudio la patogenicidad de los aislamientos obtenidos.

La evaluación sanitaria de ciertos cultivares en las campañas 2010-2011 (Perelló & Larran 2013) indican la presencia de nuevos aislamientos que se corresponden morfológicamente con el grupo de especies de *A. tenuissima* sensu Simmons (Simmons 2007) y al grupo de especies de *A. arborescens*.

El grupo *A. tenuissima* presenta conidios, 10 a más de 25, en cadenas no ramificadas, ocasionalmente aparecen ramas laterales cortas, que no son dominantes de la población y conidióforos primarios cortos (Simmons 2007). (Figuras 1.6, 1.7 y 1.8).

El grupo *A. arborescens* posee conidióforos primarios largos, erectos y solitarios, con conidios naciendo en el ápice del conidióforo en cadenas ramificadas (Simmons 2007) (Figuras 1.6 y 1.8). Este grupo fue citado en tomate en Argentina (Patriarca 2011).

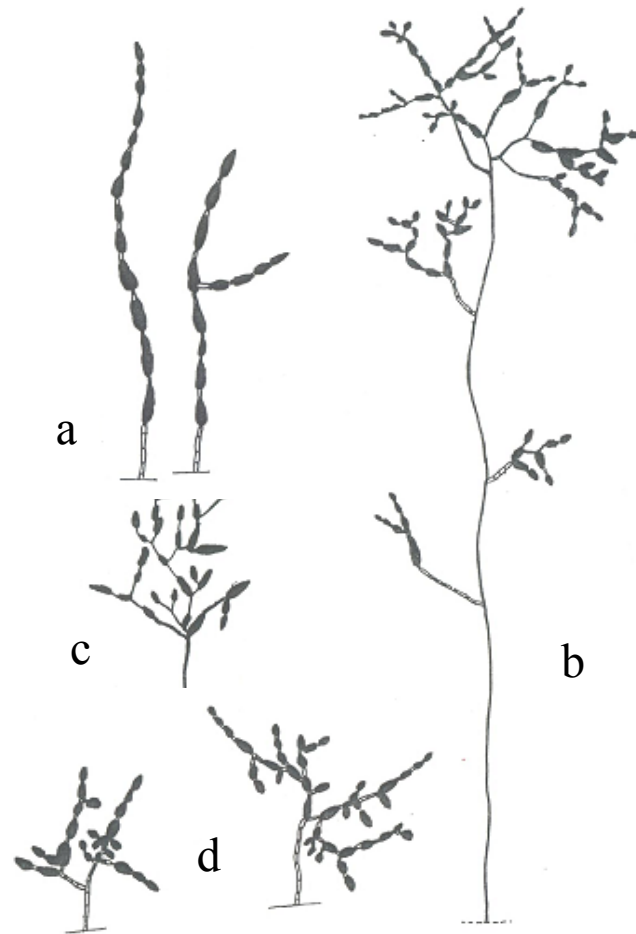


Figura 1.6: Esquema de los patrones de esporulación y morfología de conidios de los grupo-especie de *Alternaria* presentes en trigo. **Referencias:** a: *A. tenuissima*, b: *A. arborescens*, c: *A. infectoria*, d: *A. alternata*. Barra: 50 μm. Fuente: Simmons 2007.



Figura 1.7: Microfotografía de los patrones de esporulación y conidios de los grupo-especie de *Alternaria*: *A. tenuissima*, *A. infectoria* y *A. alternata*. (Magnificación 50x).
Fuente: Gannibal 2008.

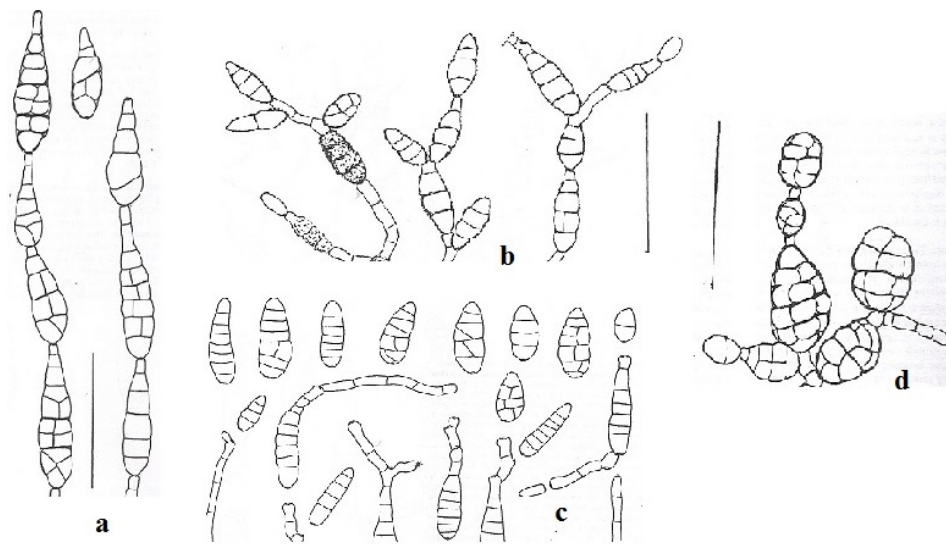


Figura 1.8: Esquema de los conidios de los grupos de especies de *Alternaria*: a *A. tenuissima*, b *A. arborescens*, c *A. infectoria* y d *A. alternata* (Barras: 50 μ m). Fuente: Simmons 2007.

1.3.2 Géneros cercanos a *Alternaria* que causan enfermedades en trigo

Existen algunos géneros en estrecha conexión con *Alternaria*, tales como *Pithomyces*, *Embellisia*, *Ulocladium* y *Stemphylium* (Pryor & Bigelow 2003).

Muestras colectadas de granos del SE de la Provincia de Buenos Aires en los últimos ciclos agrícolas, indicarían que ciertas nuevas especies afines a *Alternaria* estarían también distribuidas en la micobiota del grano de trigo, indicando una gran dinámica y plasticidad en el grupo en estudio (Perelló com. pers. 2014).

Entre estos géneros asociados a *Alternaria*, *Pithomyces* Berk. & Broome es un hongo de suelo ubicuo, cosmopolita en la naturaleza (Domsch et al. 2007) que se cita comúnmente como un hongo saprófito en las hojas muertas de más de 50 especies de plantas diferentes, especialmente en leguminosas forrajeras y gramíneas.

Pithomyces chartarum (Berk. & M.A. Curtis) M.B. Ellis fue descrito en 1874 como *Sporidesmium chartarum* por Berk. & M.A. Curtis, aislado de papel en descomposición. Es un hongo dematiáceo, con colonias de rápido crecimiento en medio de cultivo agar papa glucosado, al principio hialinas, luego gris oscuro (Domsch et al. 2007). Sus conidióforos color oliva pálido, son lisos u ocasionalmente verrucosos. Los conidios son comúnmente elipsoidales, con 3(-4) septos transversales, septos longitudinales usualmente en las células centrales, con frecuencia constrictos en el septo, color marrón claro a oscuro cuando maduros, equinulados o verrugosos. Un denticulo pequeño permanece adherido comúnmente en la base del conidio (Ellis 1971) (Figura 1.9).

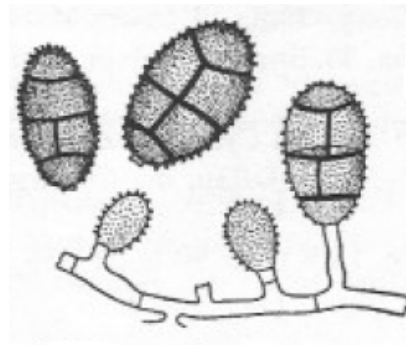


Figura 1.9: Esquema de *P. chartarum*: conidios y micelio. Fuente: Ellis 1971.

Actualmente su taxonomía según Mycobank 2015 e Indexfungorum 2015, es la siguiente:

Reino: Fungi
 Phylum: Ascomycota
 Subphylum: Pezizomycotina
 Clase: Dothideomycetes
 SubClase: Pleosporomycetidae
 Orden: Pleosporales
 Familia: Pleosporaceae
 Género: *Pithomyces*

Pithomyces chartarum se encuentra asociado generalmente a hojas y tallos en descomposición de muchas plantas. Esta especie puede crecer como saprófita en hojas de gramíneas muertas presentes en el suelo (Sutton & Gibson 1977). Existen citas del mismo en Sudáfrica, Ghana, África Central, Nigeria, Kenia, Rhodesia, Malawi, Sudán, Sierra Leona, Jamaica, Isla Mauricio, Malasia, Nueva Zelanda, Australia, Brasil, Estados Unidos, Checoslovaquia y Gran Bretaña. También se detectó en aislamientos de suelo en Japón, India, en plantaciones de bananas en Honduras y en pasturas en Australia. (Domsch *et al.* 2007).

En la base de datos del Laboratorio de Sistemática Botánica y Fúngica del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) se listan 143 especies plantas de las cuales se aisló *P. chartarum* (Farr & Rossman 2014). También está citado como patógeno de un amplio rango de plantas causando manchas foliares, entre éstas ha sido aislado de trigo (Tóth *et al.* 2007). Además de su patogenicidad, se destaca por el riesgo de producción de micotoxinas.

En Hungría, el hongo fue colectado de diferentes cultivares de trigo con síntomas foliares de necrosis. Las pruebas de patogenicidad corroboraron que *P. chartarum* era la causa de los síntomas de necrosis foliar observados (Tóth *et al.* 2007). Hasta el momento, en Argentina no se encontraron citas que asocien a este hongo con patologías en trigo, aunque es de común aparición y registro como saprófito de varias gramíneas.

Considerando este antecedente, fue de interés determinar si los aislamientos de *Pithomyces chartarum* aislados de trigo en ensayos propios, eran saprobias contaminantes o patógenos para el cultivo.

1.4 Micotoxinas producidas por las distintas especies del género *Alternaria*

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidas por un rango de especies fúngicas al final de la fase exponencial de crecimiento y durante la fase estacionaria. Generalmente las micotoxinas son compuestos químicos y térmicamente estables, que sobreviven al almacenamiento y a la mayoría de las condiciones de procesamiento de alimentos, permaneciendo presentes en los productos finales. La ingestión, inhalación o absorción cutánea de estos compuestos provoca diferentes efectos adversos en la salud de animales y personas (Pavón *et al.* 2012b).

Este riesgo puede estar dado por contaminación directa de productos agrícolas e indirecta, por la presencia de micotoxinas y sus metabolitos en tejidos animales, leche y huevos provenientes de animales cuya dieta estuvo contaminada (Koppen *et al.* 2010, Bhat *et al.* 2010).

Además es imposible eliminar estas micotoxinas una vez que han contaminado los productos alimenticios (Matic *et al.* 2008).

Los principales géneros fúngicos productores de micotoxinas son *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*. Los tres primeros están más estudiados y presentan regulaciones a nivel mundial (FAO 2004, Moss 2008).

La ocurrencia de toxinas de *Alternaria* en granos pequeños y subproductos de cereales causa gran preocupación a nivel mundial debido al riesgo potencial para humanos y/o ganado. Además, se reportó que algunas toxinas de *Alternaria* podrían tener efecto carcinogénico (Yekeler *et al.* 2001, Battilani *et al.*, 2009, Pavón Moreno *et al.* 2012a).

Las toxinas más importantes producidas por el género *Alternaria* son alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), altenueno (ALT), ácido tenuazónico (TEA) y altertoxinas (ATX-I, II, III) (Logrieco *et al.* 2009).

El género *Alternaria* produce más de 70 micotoxinas y fitotoxinas pero sólo unas pocas ocurren naturalmente en productos alimenticios y son de importancia toxicológica. Dentro del género, *A. alternata* es considerada como la especie productora de micotoxinas

más importante y está reportada su ocurrencia por ejemplo en semillas de cereales, girasol, colza, olivas y varias frutas (Battilani *et al.* 2009).

Las toxinas más importantes de *Alternaria* se dividen en tres clases estructurales principales, de acuerdo con Ostry (2008) Logrieco *et al.* (2009) y Battilani *et al.* (2009):

- Derivados de Dibenzo- α -pironas: alternariol (AOH), alternariol monometil éter (AME), altenueno (ALT), altenuisol (AS)
- Derivados del Ácido tetrámico: ácido tenuazónico (TEA)
- Derivados del perileno: altertoxinas I, II, III (ATX-I, II, III)

Pavón Moreno *et al.* (2012a) suma dos grupos:

- AAL toxinas: AAL-TA1, AAL-TA2, AAL-TB1, AAL-TB2
- Otras estructuras: tentoxina (TEN).

Las toxinas de *Alternaria* han sido detectadas en un amplio rango de granos de cereales y productos basados en ellos, como pan, cereal para desayuno, pasta, etc. (Pavón Moreno *et al.* 2012a).

Hay reportes de AOH y AME en trigo con escudete negro en Polonia, AOH y AME en trigo en Alemania; AOH, AME y TeA en trigo en Australia; AOH, AME, ATX-I, ALT, y TeA en trigo en Egipto; AOH, AME y TeA en trigo en China y AOH y ALT en trigo de la República Checa (Battilani *et al.* 2009).

En Argentina, se ha reportado la presencia de micotoxinas producidas por el género *Alternaria* en semillas de girasol (Chulze *et al.* 1995), pasas de uva (Romero *et al.* 2005), tomate (Benavidez Rozo *et al.* 2014), puré de tomates (Terminiello *et al.* 2006) y trigo (Azcarate *et al.* 2008).

Azcarate *et al.* (2008) estudiaron la ocurrencia de micotoxinas de *Alternaria* en trigo argentino proveniente de la región V Sur (cosecha 2004-05). El estudio realizado sobre 64 muestras de granos, permitió determinar la presencia de *Alternaria* como el principal componente de la micobiota observada, y, la presencia de micotoxinas producidas por este hongo. AOH fue detectado en el 6% de las muestras, con un rango de 645 a 1.388 $\mu\text{g/kg}$; AME con un rango de 566 a 7.451 $\mu\text{g/kg}$ en el 23% de las muestras; y TEA en 19% de las muestras con un rango de 1,001 a 8.814 $\mu\text{g/kg}$. AME fue la toxina predominante, aunque el TeA fue detectado en mayores concentraciones. AOH estaba presente en menor cantidad de

muestras y en menores niveles. Los niveles de toxinas detectados en este ensayo son altos, probablemente debido a la alta infección por especies de *Alternaria* encontrada en las muestras.

Patriarca *et al.* (2007) analizaron las micotoxinas AME, TEA y AOH a partir de cepas de *Alternaria* aisladas de 41 muestras de trigo provenientes de la Región triguera V Sur. De los 123 aislamientos analizados todos, excepto uno, fueron capaces de producir micotoxinas. TA fue la toxina producida a mayor concentración pero en baja frecuencia, mientras la obtención de AME y AOH fueron menores. El rango de TA producido fue amplio, oscilando entre 1-14782 mg/kg; el de AOH fue de 4-622 mg/kg y el de AME varió entre 7-2625 mg/kg.

1.4.1 Micotoxinas producidas por *Pithomyces chartarum*

La producción de toxinas del hongo *Pithomyces chartarum* es un problema grave especialmente en Nueva Zelanda, donde los animales de granja son expuestos a un pastoreo intenso. *P. chartarum*, puede producir entre otros, el alcaloide esporidesmina, micotoxina que provoca eczema facial en ganado caprino, vacuno y ovino (Sinclair 1961, Di Menna *et al.* 1970, Hansen *et al.* 1994). *P. chartarum* también produce ciclodepsipeptidos y micotoxinas del tipo de los esporidemolidos. Las esporas del hongo que contienen dichas micotoxinas, al ser liberadas en el tracto gastrointestinal, provocan una obstrucción en los conductos biliares que conduce a la lesión del hígado (Di Menna *et al.* 2009). Productos de la bilis, la clorofila y otros residuos en consecuencia se acumulan en el torrente sanguíneo del ganado causando fotosensibilidad de la piel, especialmente expuesta a la luz directa del sol (Kellerman *et al.* 1980). Esto a su vez causa irritación severa de la piel que el animal intenta aliviar frotando la cabeza contra objetos disponibles, lo que resulta en descamación de la piel. La esporidesmina puede disminuir la inmunidad y afectar la producción total en los animales de granja.

Cuando se ingiere en grandes cantidades, puede causar la muerte. Los efectos de estas micotoxinas en la salud humana son desconocidos.

El porcentaje de aislamientos de hongos que producen esta toxina varía en diferentes países. Los aislamientos toxigénicos predominan en Nueva Zelanda y Australia,

mientras que los aislamientos no tóxicos parecen prevalecer en América del Norte y del Sur.

Existen antecedentes de la presencia de *P. chartarum* en forrajes y gramíneas de Argentina (Licoff 2008). Asimismo se han registrado problemas de fotosensibilidad en ganado en nuestro país (Carrillo *et al.* 1980). Esto sumaría una adversidad potencial para el trigo en Argentina, de consecuencias aún desconocidas.

1.5 Problema planteado

Las enfermedades emergentes causadas por distintas especies de *Alternaria* en el cultivo de trigo en Argentina constituyen un área problemática que demanda el estudio actual e integral de la biología del patógeno. Por consiguiente, considerando la creciente frecuencia de aparición de *Alternaria* spp. asociada a trigo, y a la problemática de su clasificación morfológica compleja, la caracterización morfobiométrica, patogénica y molecular de estos nuevos integrantes del complejo *Alternaria* asociados a la semilla de trigo, permitiría complementar los estudios ya iniciados y contribuir a la identificación de posibles taxa aún no determinados en Argentina. El tema merece especial atención, por incluir este género, hongos fitopatógenos de interés cuarentenario (como *Alternaria triticina*) que afectarían el comercio internacional, sumado el riesgo potencial de producir micotoxinas que afecten la salud humana y animal cuya regulación no existe en Argentina y sorprendentemente, en ninguna otra parte del mundo.

Por otra parte, la correcta caracterización de estos hongos facilitará las tareas futuras de mejoramiento genético para la obtención de cultivares resistentes o de buen comportamiento frente a los aislamientos patógenos. La investigación del tema también aportaría datos concretos sobre la presencia y distribución de la composición poblacional del hongo en semillas de las distintas áreas agroecológicas muestreadas.

Existen antecedentes de la presencia de *Pithomyces chartarum* en forrajes y gramíneas de Argentina. Asimismo se han registrado problemas de fotosensibilidad en ganado en nuestro país. Sin embargo, en Argentina no se encontraron citas previas que asocien a este hongo con patologías en trigo motivo por el cual se consideró adecuado realizar estudios con *P. chartarum* para conocer su patogenicidad sobre el cultivo y la naturaleza de los metabolitos secundarios que produce.

1.6 Estado de la cuestión

Una enfermedad emergente es aquella cuyo agente causal no había sido identificado antes en ese hospedante hasta la actualidad, en un área o país determinado. Este es el caso de varias enfermedades de trigo anteriormente mencionadas, incluyendo a las causadas por el género *Alternaria*. Hasta hace relativamente pocos años *Alternaria* sólo era considerada en Argentina patógeno de trigo asociado al escudete negro en la semilla (*A. alternata*) o un patógeno débil o secundario del trigo en senescencia.

Como puntualiza Formento (2010) en los últimos años, el panorama de las enfermedades en el área triguera argentina está cambiando. Se destaca el crecimiento sostenido de algunas enfermedades conocidas y de enfermedades emergentes. Ambos tipos de enfermedades aparecen por distintos factores, entre los que se encuentran el cambio climático y los nuevos escenarios tecnológicos productivos. El cambio climático, con un aumento de las temperaturas, de las concentraciones de dióxido de carbono y ozono, sumado a los cambios en la forma de producción de la agricultura argentina, con la adopción de la siembra directa, la cual favorece la supervivencia de patógenos necrótrofos en los rastrojos presentes en superficie, todo esto produce un impacto aún no estimado y de manejo sanitario complejo.

Alternaria es un hongo de carácter necrotrófico, con lo cual la mayor fuente de inóculo se encuentra en los restos de los cultivos anteriores. En general, estos hongos pueden usar las semillas como un mecanismo de supervivencia y diseminación. Carmona (2005) cita a *Alternaria* spp. entre los principales patógenos de la semilla de trigo. En consecuencia, la semilla y el rastrojo están relacionados con la continuidad del ciclo biológico del patógeno de una generación a otra del hospedante. La supervivencia a largo plazo de las especies se da principalmente a través del micelio, que permanece viable durante un mayor período de tiempo y se conserva mejor que las esporas (Rotem 1994). Perelló & Larrán (2013) evaluaron la transmisión semilla-plántula en ensayos de laboratorio e invernáculo conducidos en el CIDEFI (UNLP). Se determinó la transmisión sintomática y asintomática a coleoptile, radícula y primera hoja desarrollada, a los 15 y 30 días de la siembra. Algunas raíces de las plántulas procedentes de las semillas inoculadas, presentaron un menor desarrollo radicular y necrosis. Estas observaciones confirman que el patógeno se transporta y transmite a la semilla desde estadios tempranos. Rotem (1994)

postula que la transmisión desde semillas infectadas o infestadas hacia plántulas se produce a través de la infección del coleoptile que emerge del suelo con restos de pericarpio contaminado.

Pithomyces chartarum es un hongo necrotrófico que se aisló en numerosos países y reportó como patógeno de trigo en Hungría, Tanzania, Brasil y África (Tóth 2007). Al ser un necrótrofo se hipotetiza que sobrevive en rastrojos del cultivo anterior. No existen al momento estudios en relación a la transmisión del patógeno ni sus formas o lugares de supervivencia. Los estudios sobre este hongo son principalmente sobre la toxina (esporidesmina) que produce y los daños que ocasiona

1.7 Hipótesis

- ✓ El complejo de especies de *Alternaria* asociado al trigo, comprende hongos ampliamente distribuidos en las diferentes regiones ecológicas trigueras de Argentina.
- ✓ Muchas otras especies de *Alternaria*, además de *A. alternata*, están asociadas al manchado de la semilla, son patógenas y producen diversas alteraciones tanto en semillas como en hojas de las plantas de trigo.
- ✓ *Pithomyces chartarum* es patógeno de trigo y produce alteraciones en semillas.
- ✓ *Pithomyces chartarum* es un hongo cercano al género *Alternaria* y podría producir metabolitos secundarios similares a los que produce este último.

1.8 Objetivos

Generales

- ✓ Determinar la presencia de diferentes grupos de *Alternaria* en semillas de trigo procedentes de distintas zonas agroecológicas de Argentina y caracterizar los aislamientos desde el punto de vista morfo-cultural, bioquímico y patogénico.
- ✓ Caracterizar aislamientos de *Pithomyces chartarum* procedentes de trigo, desde el punto de vista morfo-cultural, bioquímico y patogénico.

Particulares

- ✓ Reunir una amplia colección de aislamientos del hongo *Alternaria* y realizar una caracterización morfo cultural de los mismos.
- ✓ Corroborar la identificación morfobiométrica y cultural con técnicas moleculares (PCR).
- ✓ Identificar el hábito de comportamiento -patógeno o saprófito- de los aislamientos de *Alternaria* sobre semillas de trigo mediante pruebas de patogenicidad en invernáculo con condiciones ambientales controladas.
- ✓ Identificar el comportamiento patógeno o saprófito de los aislamientos de *Alternaria* sobre hojas de plantas de trigo mediante pruebas de patogenicidad en invernáculo con condiciones ambientales controladas.
- ✓ Determinar si los perfiles metabólicos del complejo de especies de *Alternaria* patógenas del trigo presentes en el país puede ser una herramienta útil para diferenciar los distintos grupos de especies.
- ✓ Identificar el comportamiento patógeno o saprófito de los aislamientos de *Pithomyces chartarum* sobre semillas de trigo mediante pruebas de patogenicidad bajo condiciones controladas.
- ✓ Realizar la caracterización molecular de *Pithomyces chartarum* determinado previamente a partir de caracteres morfo culturales.
- ✓ Determinar el perfil metabólico de *Pithomyces chartarum*.

Capítulo 2
MATERIALES Y MÉTODOS

2 Determinación de la presencia de *Alternaria* en semillas de trigo de diferentes zonas agroecológicas de Argentina

2.1 Origen de las semillas de trigo

El material utilizado en los ensayos procedió de muestras de semillas de trigo recolectadas de las distintas zonas trigueras de Argentina en la campaña 2011-12, según mapa adjunto (Figura 2.1). Las muestras fueron solicitadas a los coordinadores de cada subregión de la Red Nacional de Ensayos Comparativos de Variedades Comerciales de Trigo (RET) y a los responsables de las principales semilleras de trigo del país. Las mismas constaron de 100 gramos de semillas de trigo contenidas en bolsas de papel. Fue requisito que las semillas de trigo no estuvieran ventiladas y que cada bolsa estuviera identificada por variedad de trigo y por localidad de origen. Los ensayos de laboratorio fueron realizados en el Centro de Investigaciones en Fitopatologías (CIDEFI), Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y en el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA).

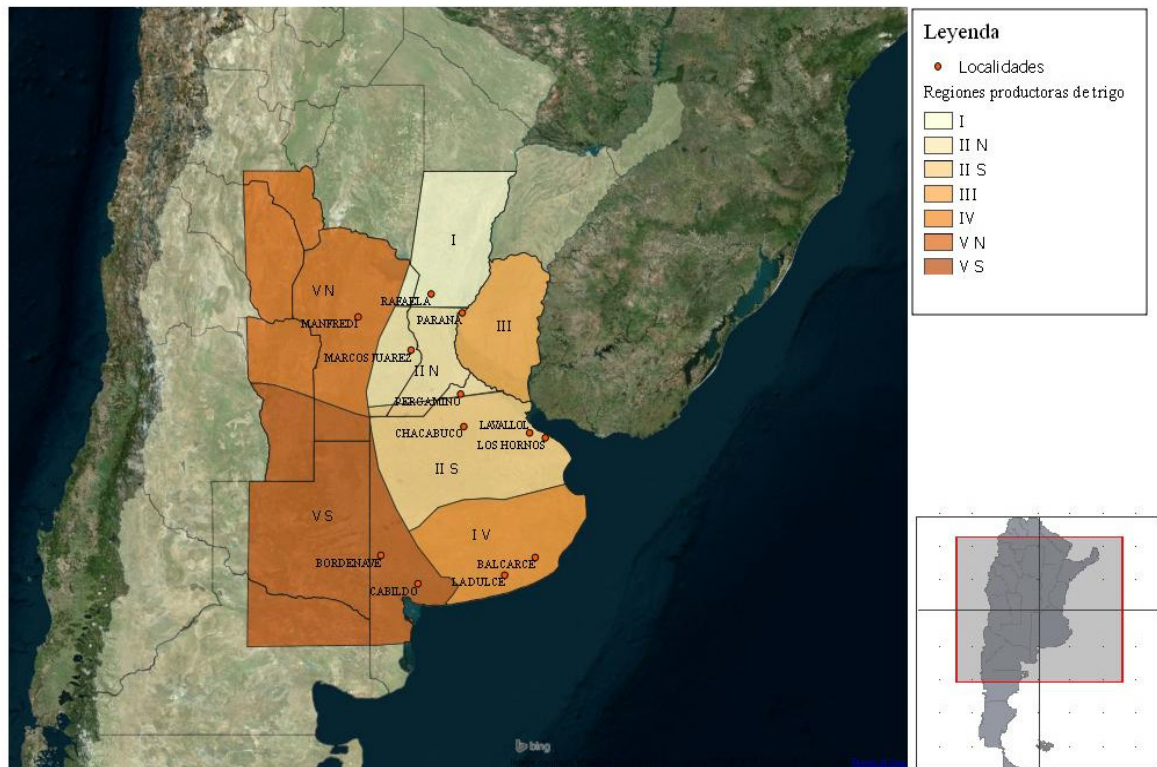


Figura 2.1: Origen de las semillas de trigo analizadas.

Obtención de los aislamientos de *Alternaria*

Las muestras de semillas procedentes de las localidades mencionadas fueron sometidas a un test de análisis de sanidad de semillas denominado prueba de agar en placa (Neergaard 1977) cuyos pasos se detallan a continuación:

Pretratamiento de las semillas: consiste en la desinfección superficial de las semillas mediante inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (1% p/v) durante 10 minutos. Luego se procede al enjuague con agua corriente durante 5 minutos y posteriormente un enjuague con agua destilada estéril.

Siembra de las semillas pretratadas: en cámara de flujo laminar se colocan 10 semillas por caja de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo medio de cultivo agar papa glucosado (APG). (Anexo 1). En el presente estudio se emplearon cinco repeticiones para cada combinación semilla/localidad.

Incubación: En cámara de cría durante 7 días con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a 24°C de temperatura.

Observación: Luego de la incubación se examina cada semilla con estereomicroscopio a 40x de amplificación, en búsqueda de colonias que posean el micelio, conidióforos y conidios típicos del género *Alternaria*.

2.2 Caracterización morfo-cultural de los aislamientos

A partir de las colonias separadas según se describe en 2.2 se realizaron aislamientos monospóricos (Choi *et al.* 1999) en cajas de Petri conteniendo medio de cultivo agar papa zanahoria (APZ, Anexo 1) para caracterizar morfológicamente las colonias, con el uso del patrón de esporulación (Simmons 2007). Para cada aislamiento se hicieron repiques en APZ que fueron incubados a 20 ± 1 °C de temperatura con un ciclo de 8 horas de luz fluorescente y 16 horas de oscuridad durante 7 días (Simmons 2007). Para determinar el grupo según el patrón de esporulación, cada aislamiento fue examinado

utilizando un estereomicroscopio a 40x de amplificación siguiendo la metodología de Simmons & Roberts (1993) y Simmons (2007).

Se contó con cultivos de referencia “tipo” prodecentes de herbarios y colecciones internacionales, a los efectos de comparación en la identificación. (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1: Aislamientos de referencia utilizados para la caracterización morfo-cultural.

Espece	Nro de Colección
<i>Alternaria tenuissima</i>	EGS 34-015
<i>Alternaria arborescens</i>	EGS 39-128
<i>Alternaria infectoria</i>	EGS 27-193
<i>Alternaria alternata</i>	EGS 34-016
<i>Alternaria triticina</i>	IMI 178784
<i>Alternaria triticina</i>	IMI 289680
<i>Alternaria triticimaculans</i>	EGS 41-050

Referencias: EGS: Colección del Dr. E.G. Simmons. IMI: Cultivo de colección del CABI Europe UK, England Centre.

Otras características y rasgos morfobiométricos considerados como criterios de clasificación fueron los siguientes: dimensión y disposición de los conidios, aspecto, color, ornamentación, número de tabiques transversales y longitudinales, presencia o no de rostro, características del conidióforo y características de la colonia en medio específico DRYES (Ver Anexo 1). El medio DRYES se utilizó además como indicador del grupo *A. infectoria*, ya que discrimina aislamientos por la producción de colonias blancas en el mismo.

2.3 Selección de aislamientos de *Alternaria*

La elección de los aislamientos de *Alternaria* destinados a los ensayos se realizó mediante la selección al azar de 10 cepas de cada uno de cuatro grupos de *Alternaria* determinados (*A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria* y *A. alternata*), de todas las zonas trigueras de Argentina, para evaluar su comportamiento. Se utilizaron un total de 40 aislamientos de *Alternaria* (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2: Identidad y origen geográfico de los aislamientos de *Alternaria* seleccionados para los ensayos de patogenicidad.

Género <i>Alternaria</i>		Origen		
Aislamiento	Grupo	Localidad	Provincia	Región triguera
1	<i>A. tenuissima</i>	Los Hornos	Bs As	II Sur
2		Chacabuco	Bs As	II Sur
3		Rafaela	Santa Fé	I
4		Marcos Juárez	Córdoba	II Norte
5		Balcarce	Bs As	IV
6		Pergamino	Bs As	II Norte
7		Manfredi	Córdoba	V Norte
8		Bordenave	Bs As	V Sur
9		La Dulce (N. Olivera)	Bs As	IV
10		Paraná	E. Ríos	III
11	<i>A. arborescens</i>	La Dulce (N. Olivera)	Bs As	IV
12		Manfredi	Córdoba	V Norte
13		Marcos Juárez	Córdoba	II Norte
14		Pergamino	Bs As	II Norte
15		Rafaela	Santa Fé	I
16		Chacabuco	Bs As	II Sur
17		Llavallol	Bs As	II Sur
18		Balcarce	Bs As	IV
19		Bordenave	Bs As	V Sur
20		Cabildo	Bs As	V Sur
21	<i>A. infectoria</i>	Los Hornos	Bs As	II Sur
22		Cabildo	Bs As	V Sur
23		Balcarce	Bs As	IV
24		La Dulce (N. Olivera)	Bs As	IV
25		Chacabuco	Bs As	II Sur
26		Paraná	E. Ríos	III
27		Manfredi	Córdoba	V Norte
28		Bordenave	Bs As	V Sur
29		Rafaela	Santa Fé	I
30		Pergamino	Bs As	II Norte
31	<i>A. alternata</i>	Manfredi	Córdoba	V Norte
32		Bordenave	Bs As	V Sur
33		Pergamino	Bs As	II Norte
34		Los Hornos	Bs As	II Sur
35		Paraná	E. Ríos	III
36		Rafaela	Santa Fé	I
37		Marcos Juárez	Córdoba	II Norte
38		Chacabuco	Bs As	II Sur
39		Balcarce	Bs As	IV
40		Cabildo	Bs As	V Sur

2.4 Caracterización molecular de los grupos de aislamientos de *Alternaria*¹

Los estudios moleculares fueron realizados en el Laboratorio de Biología Funcional y Biotecnología (Biolab, Azul), Buenos Aires, con la Dra. M.V. Moreno y el Dr. S.A. Stenglein.

Para esclarecer la identificación y diferenciación de los grupos de especies del género *Alternaria* asociados al trigo y corroborar la concordancia con la caracterización morfo-cultural de los aislamientos monospóricos seleccionados para los análisis, se eligió un aislamiento representativo de cada grupo de especies de *Alternaria* (*A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. infectoria* y *A. arborescens*). (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3: Aislamientos de los grupos de especies de *Alternaria* elegidos para los análisis moleculares.

<i>Alternaria</i>	
Grupo-especie	Aislamiento N°
<i>A. tenuissima</i>	6
<i>A. arborescens</i>	17
<i>A. infectoria</i>	22
<i>A. alternata</i>	37

Extracción del ADN

Se efectuó la extracción del ADN de un aislamiento tipo de cada grupo morfológico de acuerdo al protocolo CTAB (Cetil-trimetil-bromuro de amonio) modificado (Stenglein & Balatti 2006). El primer paso fue raspar con un bisturí, desinfectado con alcohol, el micelio de 2 placas de Petri y molerlo en un mortero utilizando nitrógeno líquido. Se añadieron a continuación 1000 µl de buffer CTAB (800 µl de buffer CTAB + 200 µl de CTAB 10 %), 1 µl de β-mercaptoetanol y 1% polivinil-pirrolidona (PVP) y se mezcló hasta obtener una consistencia semilíquida.

Luego, para desnaturalizar las proteínas, se traspasó el contenido del mortero se pasó a tubos eppendorf estériles de 2 ml y se incubó 30 min a 60°C. Transcurrido ese

¹ Aislamientos caracterizados previamente a partir de caracteres morfo-culturales

tiempo, se lavó con $\pm 600 \mu\text{l}$ de cloroformo- isoamilalcohol (12:1 v/v). Se centrifugó 5 minutos a 10000 g (máximo). Se tomó la fase líquida superior y se colocó en tubos eppendorf estériles de 2 ml, precipitando el ADN con 2/3 de volumen de isopropanol frío (500-600 μl) en el freezer (-20°C) durante una noche.

A continuación, se centrifugó por un tiempo de 7-10 minutos a 10000 g, se descartó la fase líquida; se lavó el pellet con 200-400 μl de etanol 75% - Acetato de amonio 10 mM y se centrifugó 5-10 min a 10000 g, descartando también la fase líquida. Finalmente, se realizó un lavado con etanol 70% frío (200-300 μl), se centrifugó 1-5 min (retirando luego la fase líquida), se secó el pellet (invirtiendo el eppendorf sobre un papel secante) y se resuspendió en 100 μl de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0- 1 mM EDTA).

Amplificación por PCR

A partir de la extracción de ADN de un aislamiento representativo de cada grupo, se procedió a realizar las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), para cada aislamiento, a un volumen final de 25 μl , conteniendo en el siguiente orden: Buffer de reacción 10X (20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerol, 0,5% Tween 20® y 0,5% Nonidet P40®); 2,5 mM de MgCl_2 ; 0,5 μM de cada cebador (directo y reverso); 0,05% Tween 20®, 0,05% Nonidet P40®; 200 μM de cada dNTP; 10-20 ng de ADN, 1,25 unidades de *Taq* polimerasa (Genbiotech); 10 % de solución de Cresol Red (Sigma) y agua destilada hasta completar el volumen final. Todas las reacciones fueron repetidas dos veces. Los cebadores utilizados fueron espaciadores internos de la transcripción (ITS). Los ITS rodean a la secuencia de la región codificante 5.8S del ADN ribosomal (rDNA) que está situada entre la secuencia codificante de la subunidad pequeña (SSU) y la subunidad grande (LSU) del ADN ribosomal. (Martin & Rygielwicz, 2005). Se secuenció toda la región ITS (ITS1-5.8S-ITS2) con los cebadores ITS4 e ITS5. La secuencia de los cebadores es la siguiente:

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')

El termociclador (XP Thermal Cycler, Bioer Technology Co, LTD) fue programado con un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 2 min. Luego, para un ciclo de desnaturalización a 95°C por 30 s, apareamiento a 44°C por 30 s, y extensión a 72°C por 45

s, los cuales fueron repetidos 29 veces. La reacción se finalizó con 2 minutos de extensión final a 72°C.

La determinación de la calidad del ADN se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 0,7 %. Para ello se sembraron muestras de ADN elegidas al azar en el gel. El mismo se preparó con 10 ml de TBE 5x (0,54 g de Tris base; 0,275 g de ácido bórico; 0,2 µl de EDTA, pH 8), 40 ml de agua bi destilada, 0,35 g de agarosa; se calentó 1 min en microondas y finalmente se agregaron 3 µl de GelRed™ (Genbiotech). Previo a la siembra se mezclaron 8 µl del ADN con 2 µl de bromofenol azul, el cual se utilizó para colorear las muestras y a su vez, al contener sacarosa, le proporciona densidad a las muestras para ser contenidas en la calle de sembrado del gel. Se conectó la fuente de poder a una corriente constante de 80 V durante aproximadamente 30 min.

Los fragmentos del ADN amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa 1,5 %, con una corriente de 80 V durante aproximadamente 60 min. Transcurrido ese tiempo se realizó la visualización de las bandas mediante luz UV. Para determinar el tamaño de los fragmentos se utilizaron los marcadores de peso molecular 1 Kb y 100 bp DNA Ladder (Genbiotech) con bandas distinguibles desde 500 pb a 10000 pb y desde 100 pb a 1500 pb, respectivamente. En el caso de los grupos de especies de *Alternaria* del presente ensayo el tamaño de fragmento esperado será de 600 ±40 pb. Luego se purificó el fragmento del ADN amplificado utilizando kit de purificación PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit de Invitrogen de acuerdo al protocolo (Anexo N° 2) y se envió a secuenciar al Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), CONICET, Tucumán.

Análisis de las secuencias de ADN obtenidas

La identificación de las secuencias se obtuvo realizando una comparación con las secuencias de la base de datos del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica, www.ncbi.nlm.nih.gov) ‘network server’ utilizando el algoritmo BLASTX (Altschul *et al.* 1997). El alineamiento de las secuencias y su comparación se realizó con CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994).

2.5 Identificación del comportamiento patógeno o saprófito de los aislamientos de *Alternaria*

Las pruebas de patogenicidad realizadas incluyeron dos métodos de inoculación (asperjado de hojas de plantas de trigo en fase Z1.4 e inoculación de semillas por inmersión en el inóculo) con el propósito de conocer el comportamiento patógeno o saprófito de los aislamientos de *Alternaria*. Los procedimientos comunes a ambos métodos de inoculación se detallan a continuación.

Obtención del inóculo madre

Los 40 aislamientos de *Alternaria*, previamente caracterizados morfo-culturalmente se repicaron en medio de cultivo agar papa glucosado (APG) y se incubaron durante 7-10 días a 24°C con un ciclo de 12 h de luz-oscuridad.

Luego de la incubación y crecimiento de las colonias, se colocó en cada caja de Petri 10 ml de una solución de agua destilada estéril con Tween 20 (2 gotas de Tween 20 cada 100 ml de agua destilada estéril).

Mediante un portaobjetos estéril se raspó la superficie del agar colectando el líquido con el micelio y los conidios del hongo para lograr una suspensión de inóculo que se filtró a través de muselina estéril.

Preparación de la suspensión de inóculo

Mediante el uso de un hematocitómetro, se llevó la suspensión resultante a una concentración final de 2×10^4 conidios/ml.

Preparación de las semillas de trigo a inocular

Se emplearon semillas procedentes de cinco cultivares de trigo (Cuadro 2.4). Las mismas fueron sometidas a un pretratamiento consistente en la desinfección superficial con una solución de hipoclorito de sodio al 1% (p/v) durante 3 minutos. Luego las mismas

fueron enjuagadas con agua corriente durante 15 minutos. Al finalizar el enjuague se colocaron sobre papel absorbente estéril para su oreado.

Cuadro 2.4: Cultivares de trigo utilizados en los ensayos con *Alternaria*

Número	Variedad	Ciclo
1	ACA 906	C
2	Buck SY 100	I
3	Klein Chajá	C
4	Baguette 9	I
5	BioINTA 1005	C

Referencias: C: ciclo corto, I: ciclo intermedio.

2.5.1 Pruebas de patogenicidad: inoculación de plantas de trigo en fase de desarrollo Z1.4.

Los ensayos se llevaron a cabo en el invernáculo de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Se sembraron semillas de trigo pretratadas de los cultivares seleccionados en bandejas de siembra (5 x 10) multimacetas plásticas negras de 70 cm³ de capacidad cada una con tierra fértil estéril. Se sembraron 5 semillas/maceta aleatorizando los cultivares (Figura 2.2).

Las bandejas de siembra fueron colocadas en el invernáculo con condiciones controladas de temperatura y humedad (22-24°C y 80 % humedad relativa). Las mismas fueron observadas y regadas periódicamente.

El experimento se llevó a cabo cuando las plantas alcanzaron el desarrollo de la tercera hoja verdadera y cuarta emergente, según la escala de Zadoks Z1.4 (Rawson & Gómez Macpherson 2000, Zadoks *et al.* 1974).

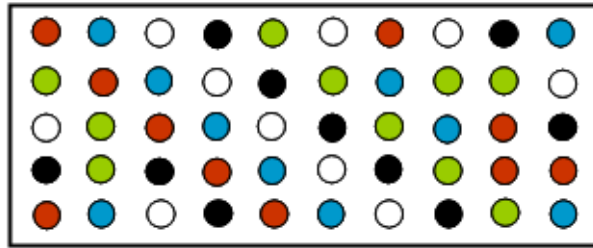


Figura 2.2: Esquema de la aleatorización de una bandeja de siembra multimacetas. Cada círculo representa una maceta. Color según cv. de trigo sembrado: azul: ACA 906, rojo: Buck SY 100, verde: Klein Chajá, blanco: Baguette 9, negro: BioINTA 1005.

Inoculación

La suspensión de inóculo fúngico se asperjó con rociador manual sobre las plantas en estadio de tercera hoja. Se realizó el ensayo con los 40 aislamientos seleccionados y los 5 cvs de trigo. En los testigos se efectuó el mismo tratamiento asperjando las plantas sólo con agua destilada estéril.

Las plantas inoculadas fueron mantenidas durante 48 h en cámara húmeda y luego en invernáculo, en condiciones ambientales controladas (22-24°C y 90 % humedad relativa). A los siete días de la inoculación se evaluó la incidencia y la severidad de la enfermedad medida a través del cálculo del índice de daño (ID) según lo descrito por Grau *et al.* (1982) en 150 hojas de cada combinación aislamiento x cultivar.

$$ID = \left(\frac{N_1 + 2N_2 + 3N_3}{3N} \right) \times 100$$

Referencias:

ID= Índice de severidad del daño.

N= Número total de hojas.

N₁, N₂, N₃ = Cantidad de hojas examinadas por cada grado de incidencia.

1, 2, 3 = grado de severidad del daño.

Las categorías de severidad consideradas fueron:

0=Hoja sana.

1= Severidad baja, hoja con menos del 5% de la superficie foliar afectada.

2= Severidad media, hoja con un 5 a 25% de superficie foliar afectada.

3= Severidad alta, hoja con más del 25% de la superficie foliar afectada.

Análisis estadístico

Con el objeto de conformar grupos de aislamientos con comportamiento similar en relación a la incidencia (I) y al índice de daño (ID) relativos a los 5 cultivares de trigo utilizados, se construyeron 10 variables. Cinco de ellas con los datos de incidencia observados en los distintos cultivares y las restantes variables con los ID producidos en cada cultivar.

Se efectuaron análisis descriptivos univariados y análisis multivariados (Cuadras 2014, Peña 2002). Con relación a los análisis multivariados, se realizó un análisis de correlaciones entre todas las variables.

Posteriormente se realizó un análisis exploratorio de los componentes principales (ACP), que incluyó gráficos de biplots, para I e ID. Se efectuó un análisis de conglomerados (AC) por separado para I e ID. Para AC se empleó la matriz de distancias euclídeas y para la selección del método jerárquico de agrupamiento se usó el coeficiente de correlación cofenética (Sokal & Rohlf 1962).

Se emplearon los software InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2012) y SAS (SAS 2009) y se consideró un nivel de significación del 5%.

2.5.2 Pruebas de patogenicidad: inoculación de semillas de trigo

Las semillas pretratadas de los distintos cultivares de trigo se sumergieron en la suspensión de inóculo de cada aislamiento de *Alternaria* por separado, mediante un agitador durante 30 minutos. En los testigos se efectuó el mismo tratamiento sumergiendo las semillas en agua destilada estéril. Luego, se colocaron las semillas así inoculadas sobre papel de filtro y algodón humedecidos con agua destilada estéril dentro de una bandeja transparente de plástico, previamente desinfectada con alcohol 70 % (v/v). Se colocaron 40 semillas por bandeja (unidad experimental), con dos repeticiones por cada combinación cultivar de trigo-aislamiento inoculado. El diseño fue completamente aleatorizado con un arreglo factorial de los factores cultivar y aislamiento.

Las bandejas conservaron tapadas para mantener la humedad. Se mantuvieron en invernáculo, en condiciones ambientales controladas (22-24°C y 80 % humedad relativa) durante doce días.

Se determinó el número de plántulas normales, plántulas anormales y semillas no germinadas en cada repetición. Dentro de plántulas anormales se determinaron separadamente las que presentaban: radícula debilitada y/o acortada, radícula necrótica, coleoptile debilitado y/o acortado, semillas manchadas según lo descrito en las normas ISTA (Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (Draper 1991). Los valores se expresaron en porcentaje.

Análisis estadístico

Se efectuaron estadísticas descriptivas univariadas. Con el objeto de conformar grupos de aislamientos con comportamiento similar con relación a las variables semilla germinada (SG), semilla manchada (SM), radícula debilitada y acortada (RDyA), radícula necrosada (RN) y coleoptile debilitado y acortado (CDyA) relativas a los cinco cultivares de trigo utilizados, se construyeron cinco variables, con los promedios de cada cultivar para cada aislamiento. Se efectuaron análisis multivariados de componentes principales (ACP) y de conglomerados (AC). Los resultados del ACP se graficaron en biplot que permiten la representación en dos dimensiones (primera y segunda componente principal) de los datos y variables medidas en simultáneo (Cuadras 2014). Para AC se empleó la matriz de distancias euclídeas; la selección del método jerárquico de agrupamiento se realizó a través del coeficiente de correlación cofenética (Sokal & Rohlf 1962). y en todos los casos resultó ser el método de encadenamiento promedio o UPGMA. Se emplearon los software InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2012) y SAS (SAS 2009).

2.6 Determinación de los perfiles metabólicos del complejo de especies de *Alternaria* patógenas del trigo presentes en Argentina

Se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución en conjunto con espectrometría de masas (LC/MS-MS) adaptando el protocolo de Vishwanath *et al.* (2009).

Las pruebas bioquímicas para la detección de las toxinas de representantes de los cuatro grupos de *Alternaria* se llevaron a cabo en el Centre for Analytical Chemistry, Tulln, Austria bajo la supervisión del Dr. R. Labuda.

Preparación de las muestras

Los aislamientos seleccionados crecieron en el medio agar extracto de levadura sacarosa (YES), (Anexo 1) a 25 °C en oscuridad durante 14 días siguiendo el método descrito por Samson *et al.* (2002).

El micelio del hongo fue mezclado con 5 ml de solvente de extracción acetonitrilo/agua/ácido acético (79:20:1 v/v/v), agitado por 10 minutos de acuerdo a lo establecido por Vishwanath *et al.* (2009). Las muestras se extraen luego de 90 minutos de agitación, seguido por el centrifugado por 10 minutos por muestra. Luego se tomaron 100 µl que fueron filtrados y redissueltos en 1000 µl de agua-acetonitrilo (1:1 v/v) y finalmente los extractos diluidos aplicados sobre el sistema LC-MS/MS.

Instrumental utilizado

Para detectar y cuantificar los metabolitos del hongo se utilizó el equipamiento QTrap Sistema LC-MS/MS 5500 (Biosystems, CA, USA) equipado con una fuente de ionización Turbo Ion Spray electrospray (ESI) y un sistema HPLC 1290 Series (Agilent, Waldbronn, Germany). La separación cromatográfica fue realizada a 25 °C en una columna Gemini C₁₈, 150 x 4.6 mm i.d., 5 µm de tamaño de partícula, equipado con C₁₈ con cartucho de seguridad 4 x 3 mm i.d. (Phenomenex, CA, USA).

2.7 Caracterización morfológica y cultural de los aislamientos de *Pithomyces chartarum*.

Aislamientos

Para los ensayos se utilizaron dos aislamientos de *Pithomyces chartarum*. Los mismos fueron obtenidos a partir de semillas de trigo recolectadas en Llavallol (Buenos Aires).

Caracterización morfológica de los aislamientos

Se realizaron aislamientos monospóricos en APG para caracterizar morfológicamente las colonias. Los mismos fueron incubados a 24 ± 1 °C con un ciclo de 12 h de luz fluorescente-oscuridad durante siete días. Cada aislamiento fue examinado utilizando un estereomicroscopio con 40x de amplificación y luego microscopio binocular (400x de amplificación) para caracterización de los conidios.

Las colonias obtenidas de *P. chartarum* se cultivaron en APG al 2% y se conservaron en frío (5°C) hasta el momento de su empleo.

2.8 Caracterización genética de *P. chartarum* mediante un análisis molecular

Para esclarecer la identificación de *Pithomyces chartarum* y corroborar la concordancia con la caracterización morfo-cultural de los aislamientos monospóricos seleccionados para los análisis, se eligió uno representativo de *P. chartarum*.

La extracción del ADN, amplificación por PCR y análisis de las secuencias de ADN obtenidas se realizó con la misma metodología anteriormente descrita en el punto 2.4.

2.9 Pruebas de patogenicidad de los aislamientos de *P. chartarum* mediante inoculaciones en semilla de trigo.

Obtención del inóculo madre

Los aislamientos de *P. chartarum* se repicaron en medio de cultivo APG y se incubaron durante 7 a 10 días a 24°C con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Luego de la incubación y crecimiento de las colonias, se colocaron en cada caja de Petri 10 ml de una solución de agua destilada estéril con Tween 20 (2 gotas de Tween 20 cada 100 ml de agua destilada estéril). Mediante un portaobjetos estéril se raspó la superficie del agar colectando el líquido con el micelio y conidios del hongo. Éste se filtró a través de muselina estéril y con un hematocitómetro, se llevó la solución resultante a una concentración final de 3×10^3 conidios/ml (Tóth *et al.* 2007).

Genotipos de trigo utilizados para la inoculación

Se evaluó su comportamiento en nueve cultivares de trigo que se describen en el Cuadro 2.5

Cuadro 2.5: Cultivares de trigo utilizados en los ensayos con *P. chartarum*

Número	Variedad	Ciclo
1	Buck Meteoro	I
2	Buck Taita	L
3	Buck SY 300	I
4	Buck SY 100	I
5	Buck Guapo	L
6	Buck 55 CL	C
7	BioINTA 1004	C
8	Klein Proteo	C-I
9	Klein Pantera	L

Referencias: C: ciclo corto, I: ciclo intermedio, L: ciclo largo.

Pretratamiento de las semillas

Se realizó una previa desinfección superficial de las semillas con una solución de hipoclorito de sodio al 1% (p/v) durante 3 minutos. Luego las mismas fueron enjuagadas con agua corriente durante 15 minutos. Al finalizar el enjuague se colocaron sobre papel absorbente estéril para su oreado.

Inoculación artificial de la semilla

Las semillas pretratadas se sumergieron en la suspensión de inóculo y se agitó durante 30 minutos. En los testigos se efectuó el mismo procedimiento sumergiendo las semillas en agua destilada estéril. Luego de dicho período se colocaron las semillas inoculadas separadas por espacios uniformes sobre papel de filtro y algodón humedecidos con agua destilada estéril dentro de una bandeja transparente de plástico, previamente desinfectada con alcohol 70 % (v/v). Se colocaron 20 semillas por bandeja, con cuatro repeticiones. El diseño estadístico fue completamente aleatorizado con un arreglo factorial de los factores cultivar y aislamiento.

Las bandejas se mantuvieron tapadas para conservar la humedad. Las mismas se incubaron en invernáculo, en condiciones ambientales controladas (22-24°C y 80 % humedad relativa) durante catorce días. Luego de este período se evaluó el porcentaje de semillas germinadas, semillas manchadas, coleoptiles necrosados y plántulas emergidas debilitadas a partir de esas semillas infectadas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos promedios de los 9 cultivares de trigo y los dos aislamientos de *Pithomyces chartarum* más un testigo se realizó para las variables semilla germinada (SG), semilla manchada (SM), coleoptile necrosado (CN) y plántula debilitada (PD).

Al igual que el procesamiento de datos de *Alternaria* ya descripto, se efectuaron análisis multivariados de los componentes principales (ACP) y de conglomerados (AC). Los resultados del ACP se graficaron en biplot que permiten la representación en dos dimensiones (primera y segunda componente principal) de los datos y variables medidas en simultáneo (Cuadras 2014). Para AC se empleó la matriz de distancias euclídeas; la

selección del método jerárquico de agrupamiento se realizó a través del coeficiente de correlación cofenética y en todos los casos resultó ser el método de encadenamiento promedio o UPGMA.. Luego se efectuaron análisis de varianzas de las variables en forma individual. Cuando se detectó heterogeneidad de varianzas se emplearon modelos mixtos (Mc Culloch & Searle 2001). Se empleó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey y se trabajó con un nivel de significación del 5%. Se emplearon los software InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2012) y SAS (SAS Institute Inc. 2009).

2.10 Análisis de metabolitos secundarios asociados a *Pithomyces chartarum*

Técnica empleada

Se empleó la misma técnica descrita para la determinación de los metabolitos de *Alternaria*.

Se determinó la producción de las toxinas alternariol (AOH), alternariolmonometileter (AME), altenueno (ALT), Altertoxina I y II (ATX-I, ATX-II), ácido tenuazoico (TeA) y tentoxina (TEN) en el aislamiento de *P.chartarum* enviado para este análisis.

Capítulo 3

RESULTADOS

3.1 Determinación de la presencia de los diferentes grupos de *Alternaria* en semillas de trigo de distintas zonas agroecológicas de Argentina a partir de caracteres morfo-culturales.

Se determinó la presencia de cuatro grupos de especies de *Alternaria*: *A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria* y *A. alternata* en todas las muestras de semillas analizadas. Las Figuras 3.1, 3.2 y 3.3 ilustran los caracteres diferenciales de las colonias y patrones de esporulación de los mismos.

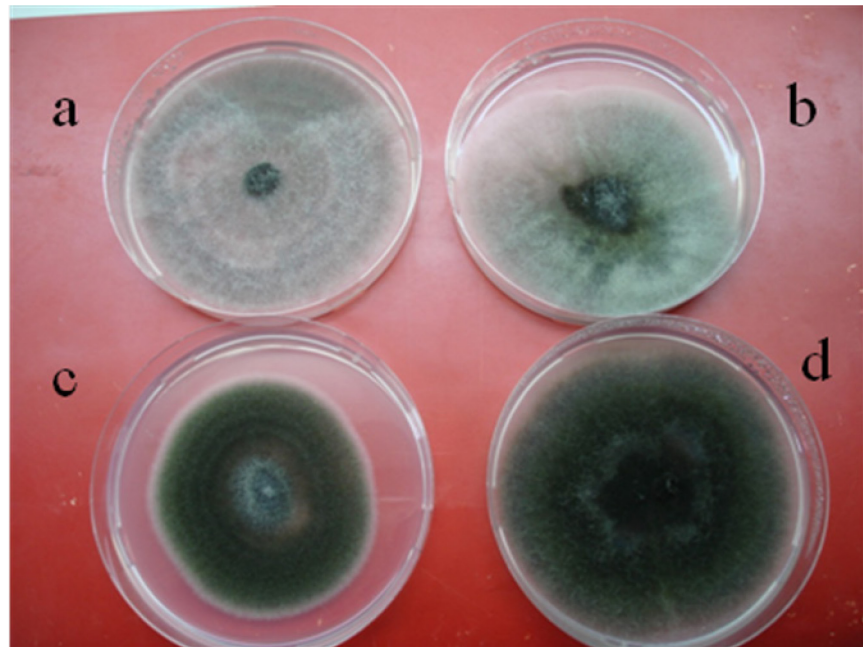


Figura 3.1: Colonias en APZ luego de siete días de incubación de los grupos de especies *Alternaria*: a *A. tenuissima*., b *A. arborescens*, c. *A. infectoria*. y d *A. alternata*.

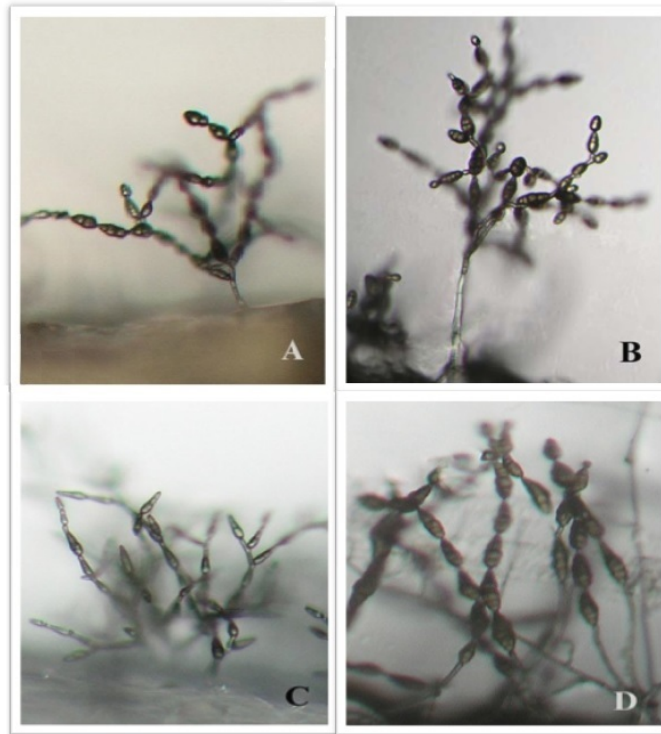


Figura 3.2: Patrones de esporulación en APZ a los siete días de incubación de los grupos de especies *Alternaria*: a *A. alternata*, b *A. arborescens*, c *A. infectoria* y d *A. tenuissima*.

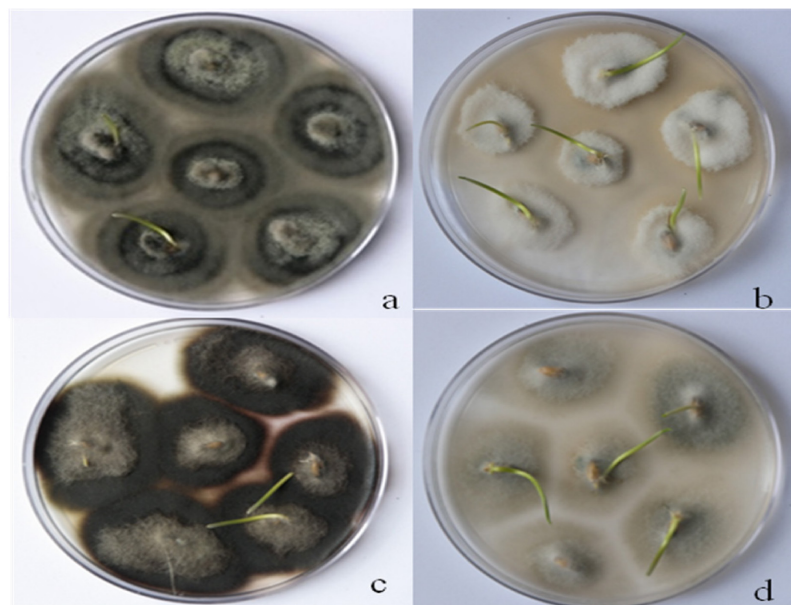


Figura 3.3: Colonias de siete días en medio DRYES. Sólo los aislamientos del grupo especie *A. infectoria* dan colonias color blanco (b). Grupo de especies de *Alternaria*: a *A. alternata*., b *A. infectoria*, c *A. arborescens* y d *A. tenuissima*.

De acuerdo a los caracteres morfoculturales observados en cada una de las muestras y zonas trigueras, se obtuvieron la frecuencia de aparición de los grupos de especies de *Alternaria* estudiados y su presencia en todas las zonas trigueras tradicionales del país.

El grupo nn corresponde a aquellos aislamientos que continúan bajo estudio y que aún no han sido identificados (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1: Frecuencia de aparición de los distintos grupos de especies de *Alternaria* según la región triguera.

Región triguera	Frecuencia de aparición total de grupos de especies de <i>Alternaria</i> (%)				
	<i>te</i>	<i>arb</i>	<i>inf</i>	<i>alt</i>	nn
I	36	25	80	75	12
II Norte	33	20	79	79	11
II Sur	35	26	89	78	10
III	38	26	86	77	13
IV	40	29	89	78	15
V Norte	31	23	76	73	12
V Sur	30	22	75	70	11

Referencias: *te* *A. tenuissima*, *arb* *A. arborescens*, *inf* *A. infectoria*, *alt* *A. alternata*, nn. aislamientos sin identificar.

3.2 Caracterización molecular de los grupos de aislamientos determinados previamente a partir de caracteres morfo-culturales

El análisis molecular corroboró la identificación según la caracterización morfo-cultural previamente realizada (Cuadro 3.2).

En el Anexo 3 se puede observar el análisis del Genbank, que incluye la secuencia completa de los fragmentos estudiados.

Cuadro 3.2: Análisis moleculares realizados a un aislamiento de cada grupo-especie de *Alternaria*.

Grupo-especie	<i>Alternaria</i>			Origen	Accesion Number	GeneBank
	Aislamiento N°	Hospedante/ sustrato				Especie
<i>A. tenuissima</i>	6	<i>T. aestivum</i> semilla		Argentina	JX454535	<i>A. tenuissima</i>
<i>A. arborescens</i>	17	<i>T. aestivum</i> semilla		Argentina	JX454533	<i>A. arborescens</i>
<i>A. infectoria</i>	22	<i>T. aestivum</i> semilla		Argentina	JX454532	<i>Lewia infectoria</i>
<i>A. alternata</i>	37	<i>T. aestivum</i> semilla		Argentina	JX454534	<i>A. alternata</i>

3.3 Identificación del comportamiento patógeno de los aislamientos de *Alternaria*

3.3.1 Pruebas de patogenicidad en hojas de trigo

Las pruebas de patogenicidad permitieron detectar la existencia de correlaciones entre la incidencia (I) e índice de daño (ID) para los cinco cultivares de trigo evaluados, considerando los 40 aislamientos de *Alternaria* spp. más el testigo (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3: Correlaciones entre incidencia (I) e ID en los cinco cultivares de trigo inoculados.

Variables		Incidencia por cultivar					Índice de daño por cultivar				
		ACA 906	Buck SY 100	Klein Chajá	Baguette 9	BioINTA 1005	ACA 906	Buck SY 100	Klein Chajá	Baguette 9	BioINTA 1005
I	ACA 906	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0009	0,0114	0,0640	0,1032	0,1075
	Buck SY 100	0,83	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0090	0,0021	0,0558	0,1038	0,1015
	Klein Chajá	0,79	0,77	1	<0,0001	<0,0001	0,0105	0,0482	0,0771	0,1106	0,2219
	Baguette 9	0,65	0,76	0,76	1	<0,0001	0,0015	0,0026	0,0051	0,0015	0,0742
	Bio INTA 1005	0,61	0,74	0,67	0,61	1	0,1609	0,1436	0,2310	0,6222	0,3944
ID	ACA 906	0,50	0,40	0,40	0,48	0,22	1	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0001
	Buck SY 100	0,39	0,47	0,31	0,46	0,23	0,79	1	<0,0001	0,0001	<0,0001
	Klein Chajá	0,29	0,30	0,28	0,43	0,19	0,72	0,66	1	<0,0001	<0,0001
	Baguette 9	0,26	0,26	0,25	0,48	0,08	0,63	0,56	0,86	1	<0,0001
	Bio INTA 1005	0,26	0,26	0,19	0,28	0,14	0,57	0,61	0,75	0,73	1

Debajo de la diagonal figuran las correlaciones de Pearson y por encima, los valores p.

Las correlaciones entre las variables son positivas por lo cual el análisis de componentes principales (ACP) tiene la característica de presentar componentes de tamaño y de forma, siendo la primera componente un promedio ponderado de las variables involucradas (incidencia e índice de daño) y las siguientes, en general tienen coordenadas positivas y negativas, que implican que contraponen unos grupos de variables frente a otros. Es decir, el primer componente ordena de menor a mayor los aislamientos según su incidencia o índice de daño.

En el análisis combinado de I e ID se observó que con dos componentes se captura el 77% de la variabilidad de los datos (Cuadro 3.4). Los valores de la primera componente se construyen a partir de un promedio ponderado de las 10 variables involucradas (incidencia e índice de daño para cada cultivar) y en los valores de la segunda componente

se contraponen las variables asociadas a incidencia con las variables asociadas a ID (Cuadro 3.5).

Cuadro 3.4: Contribución de cada componente a la variabilidad total en el ACP.

Autovalores	Valor	Proporción	Prop. Acum.
1	5,41	0,54	0,54
2	2,33	0,23	0,77
3	0,60	0,06	0,83
4	0,46	0,05	0,88
5	0,38	0,04	0,92

Cuadro 3.5: Coeficientes que definen los dos primeros componentes principales

Variables	Coef. CP 1	Coef. CP 2
I_ACA 906	0,33	0,29
I_Buck Sy 100	0,34	0,32
I_Klein Chajá	0,32	0,34
I_Baguette 9	0,35	0,20
I_BioINTA 1005	0,26	0,38
ID_ACA 906	0,34	-0,23
ID_Buck Sy 100	0,32	-0,23
ID_Klein Chajá	0,32	-0,37
ID_Baguette 9	0,30	-0,37
ID_BioINTA 1005	0,27	-0,37

Las incidencias se asocian positivamente con la segunda componente, mientras que los ID lo hacen en forma negativa con ésta (Cuadro 3.6).

Cuadro 3.6: Correlaciones entre los componentes principales y las variables originales

Variables	CP 1	CP 2
I_ACA 906	0,77	0,44
I_Buck Sy 100	0,80	0,49
I_Klein Chajá	0,75	0,51
I_Baguette 9	0,81	0,30
I_BioINTA 1005	0,61	0,58
ID_ACA 906	0,78	-0,35
ID_Buck Sy 100	0,75	-0,36
ID_Klein Chajá	0,74	-0,56
ID_Baguette 9	0,69	-0,57
ID_BioINTA 1005	0,64	-0,56

En el biplot construido (Figura 3.4) se observa que hay aislamientos de un mismo grupo de especies que presentan incidencias altas o bajas, así como también se observan ID diversos dentro de un mismo grupo de especies. Tanto la incidencia como el ID crecen a lo largo del eje correspondiente a la primera componente, mostrando que el control no presenta daño. La mayor incidencia corresponde a los aislamientos 7 y 9 (grupo de especies *A. infectoria*) y el aislamiento 15 (grupo de especies *A. alternata*). Por su parte, se destaca el aislamiento 23 perteneciente al grupo de especies *A. tenuissima* como una de las que inducen el mayor ID respecto al resto de los aislamientos analizados.

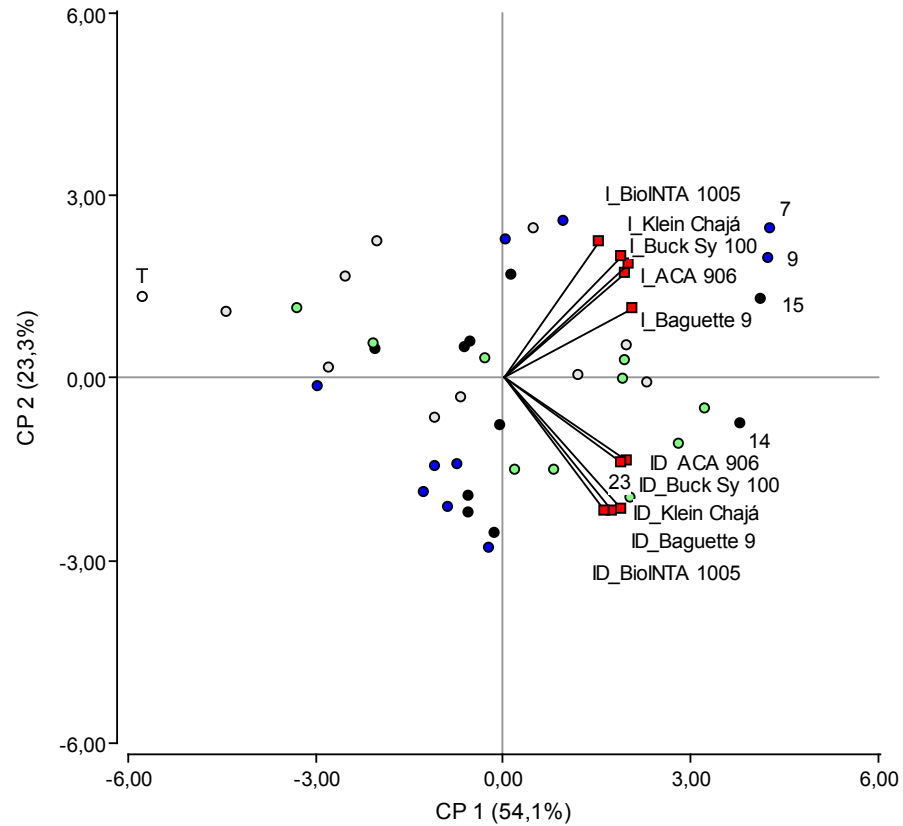


Figura 3.4: Biplot de las dos variables analizadas: incidencia (I) e índice de daño (ID) en función de los aislamientos de *Alternaria* diferenciadas según grupo de especies (*A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria* y *A. alternata*) en los cinco cultivares de trigo. **Referencias:**

● *A. tenuissima* ● *A. arborescens* ● *A. infectoria* ● *A. alternata* ○ Testigo

Análisis de incidencia

En el análisis de la incidencia de la enfermedad, se observa que con dos componentes se captura el 86% de la variabilidad total de la información (Cuadro 3.7).

Los valores de la primera componente se construyeron a partir de un promedio ponderado de las incidencias asociadas a los cinco cultivares de trigo empleados. En los valores de la segunda componente se contraponen el cultivar BioINTA 1005 y Buck SY 100 con los restantes cultivares con ponderaciones similares (Cuadro 3.8). En el Cuadro 3.9 se observa que la incidencia de BioINTA 1005 se asocia positivamente con la segunda componente.

Cuadro 3.7. Contribución de cada componente a la variabilidad total en el ACP.

Autovalores	Valor	Proporción	Prop. Acum.
1	3,88	0,78	0,78
2	0,42	0,08	0,86
3	0,36	0,07	0,93
4	0,23	0,05	0,98
5	0,11	0,02	1,00

Cuadro 3.8: Coeficientes que definen los dos primeros componentes principales.

Variables	Coef. CP 1	Coef. CP 2
I_ACA 906	0,45	-0,34
I_Buck Sy 100	0,47	0,02
I_Klein Chajá	0,46	-0,24
I_Baguette 9	0,43	-0,25
I_BioINTA 1005	0,42	0,87

Cuadro 3.9: Correlaciones entre los componentes principales y las variables originales.

Variables	CP 1	CP 2
I_ACA 906	0,88	-0,22
I_Buck Sy 100	0,93	0,01
I_Klein Chajá	0,91	-0,15
I_Baguette 9	0,86	-0,17
I_BioINTA 1005	0,82	0,57

En la Figura 3.5 se observa que hay aislamientos de un mismo grupo de especies que presentan tanto incidencias altas como bajas. La incidencia crece a lo largo del eje correspondiente a la primera componente, mostrando en un extremo el control (que no presenta daño). En el otro extremo, los aislamientos 7 y 9 (grupo de especies *A. tenuissima*) y 15 (grupo de especies *A. arborescens*) se destacan entre los de mayor incidencia (Figura 3.4). Los aislamientos del grupo *A. infectoria* presentan menor variabilidad con relación a la incidencia en todos los cvs. de trigo analizados, en comparación con el comportamiento manifestado por los aislamientos del grupo de especies *A. tenuissima*. Los cultivares Klein

Chajá, Baguette 9 y ACA 906 presentan un comportamiento similar con relación a la incidencia de los distintos aislamientos.

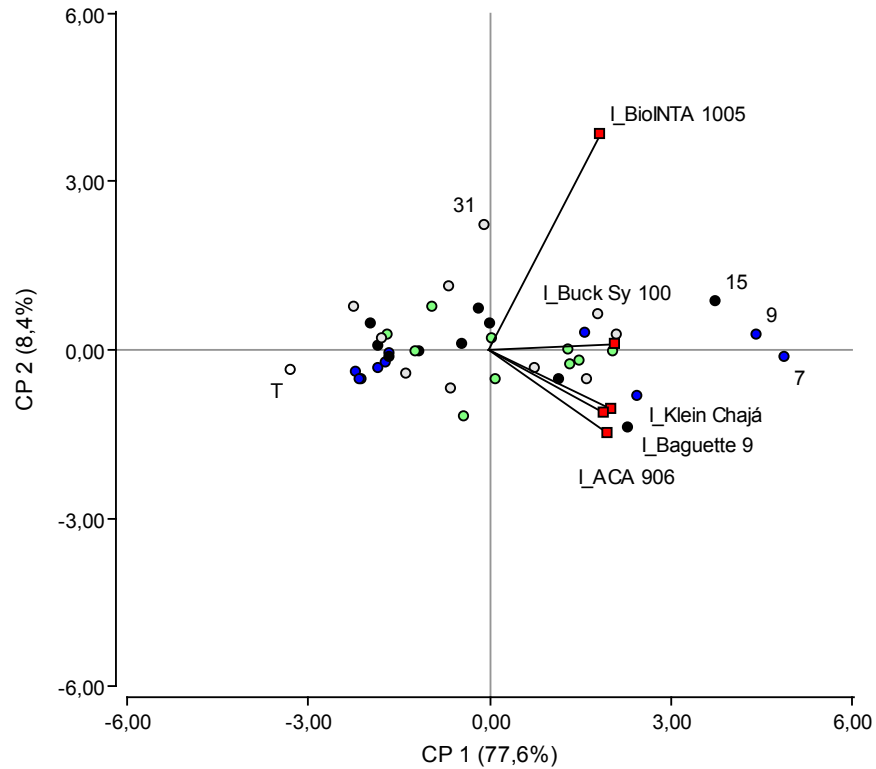


Figura 3.5: Biplot de la variable incidencia (I) en función de los aislamientos de *Alternaria* diferenciadas según grupo de especies (*A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria* y *A. alternata*) en los cinco cvs de trigo. **Referencias:**

● *A. tenuissima* ● *A. arborescens* ● *A. infectoria* ● *A. alternata* ○ Testigo

Análisis del índice de daño

Cuando se analizó el índice de daño (ID), se observó que con dos componentes se captura el 87% de la variabilidad total de la información (Cuadro 3.10).

Cuadro 3.10. Contribución de cada componente a la variabilidad total en el ACP.

Autovalores	Valor	Proporción	Prop Acum
1	3,75	0,75	0,75
2	0,61	0,12	0,87
3	0,33	0,07	0,94
4	0,18	0,04	0,97
5	0,13	0,03	1,00

Los valores de la primera componente se construyeron a partir de un promedio ponderado de los ID asociados a los cinco cultivares empleados. En los valores de la segunda componente se contraponen los genotipos ACA 906 y Buck SY 100 con los restantes cultivares con ponderaciones similares (Cuadro 3.11).

Cuadro 3.11: Coeficientes que definen los dos primeros componentes principales.

Variables	Coef. CP 1	Coef. CP 2
ID_ACA 906	0,44	0,51
ID_Buck SY 100	0,43	0,59
ID_Klein Chajá	0,48	-0,24
ID_Baguette 9	0,45	-0,44
ID_BioINTA 1005	0,44	-0,37

En el cuadro 3.12 se observa que el ID de los genotipos ACA 906 y Buck SY 100 se asocian positivamente con la segunda componente.

Cuadro 3.12: Correlaciones entre los componentes principales y las variables originales.

Variables	CP 1	CP 2
ID_ACA 906	0,85	.0,40
ID_Buck Sy 100	0,83	0,46
ID_Klein Chajá	0,93	-0,19
ID_Baguette 9	0,87	-0,35
ID_BioINTA 1005	0,84	-0,29

En el biplot correspondiente al ID (Figura 3.6) se observa que el aislamiento 35 (perteneciente al grupo de especies *A. alternata*) presentó menor ID para los trigos ACA 906 y Buck SY 100. El aislamiento 2 por el contrario (perteneciente al grupo de especies *A. tenuissima*), presentó mayor ID en los trigos Klein Chajá, Baguette 9 y BioINTA 1005.

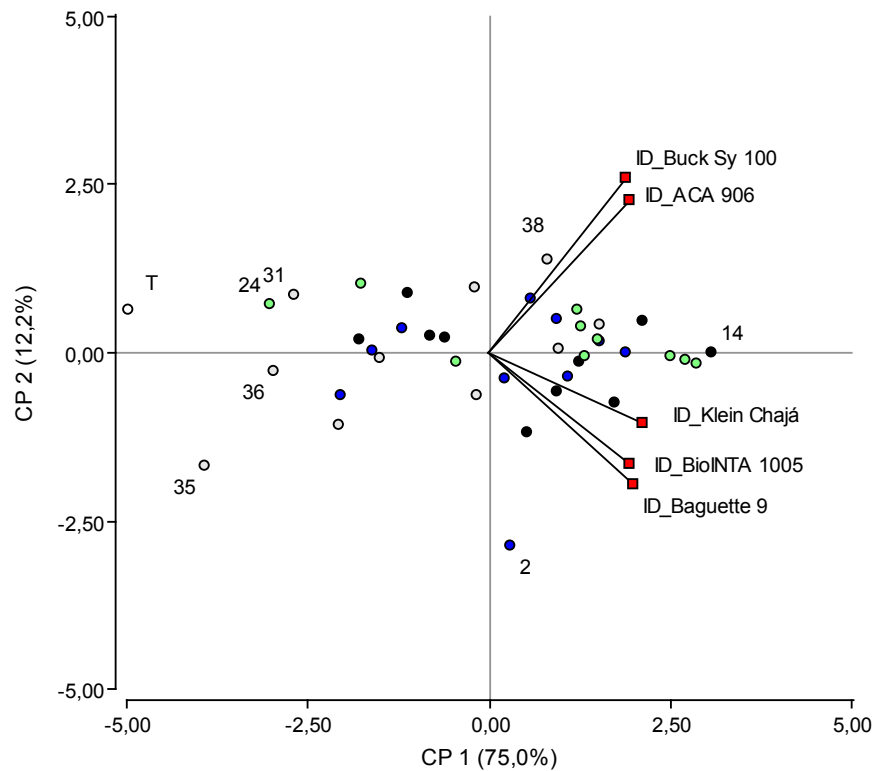


Figura 3.6: Biplot de la variable índice de daño (ID) en función de los aislamientos de *Alternaria* diferenciadas según grupos (*A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria* y *A. alternata*) en los cinco cvs. de trigo. **Referencias:**

● *A. tenuissima* ● *A. arborescens* ● *A. infectoria* ● *A. alternata* ○ Testigo

Para la incidencia y el ID el método jerárquico de agrupamiento que resultó con mayor coeficiente de correlación cofenética fue el Promedio (UPGMA).

Para ambos parámetros evaluados (I e ID) se conformaron 3 grupos de comportamiento patogénico que se denominaron bajo, medio y alto. Los grupos formados no se corresponden con los grupos morfológicos ni tampoco fueron los mismos para las dos variables analizadas.

En la Figura 3.7 se presenta el dendrograma correspondiente a la incidencia a partir del ACP. Como ya fuera señalado, los aislamientos 7, 9 y 15 conforman el grupo que provocó la mayor incidencia, respecto al resto de los aislamientos analizados.

Se observa que cada cluster de incidencia contiene representantes de los diferentes grupos taxonómicos de *Alternaria* sin que haya una asociación entre grupo de especies y nivel de incidencia.

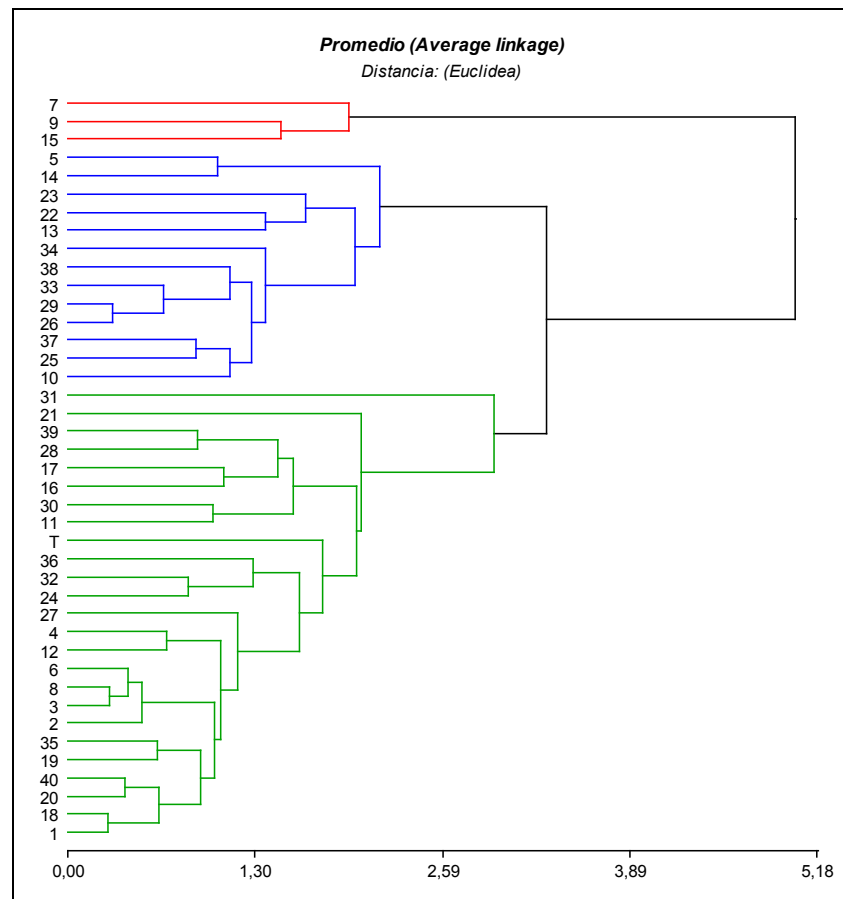


Figura 3.7: Dendrograma asociado a la incidencia de 40 aislamientos de *Alternaria* spp. en hojas de cinco cultivares de trigo. **Referencias:** rojo: incidencia alta; azul: incidencia media; verde: incidencia baja.

Con relación al ID, el aislamiento 35 es el único que se agrupa con el testigo formando el grupo de baja severidad medido como ID. Para esta variable, los representantes taxonómicos del grupo alto son numerosos (Figura 3.8). Al igual que lo observado para la incidencia, el grupo mayoritario que manifestó el mayor ID en todos los cultivares estuvo conformado por aislamientos de grupos de especies diferentes.

No se asociaron los grupos formados en el dendrograma del ID con un grupo de especies en particular, sino que cada uno de los grupos de especies de *Alternaria* analizados tiene representantes en los tres grupos de índice de daño.

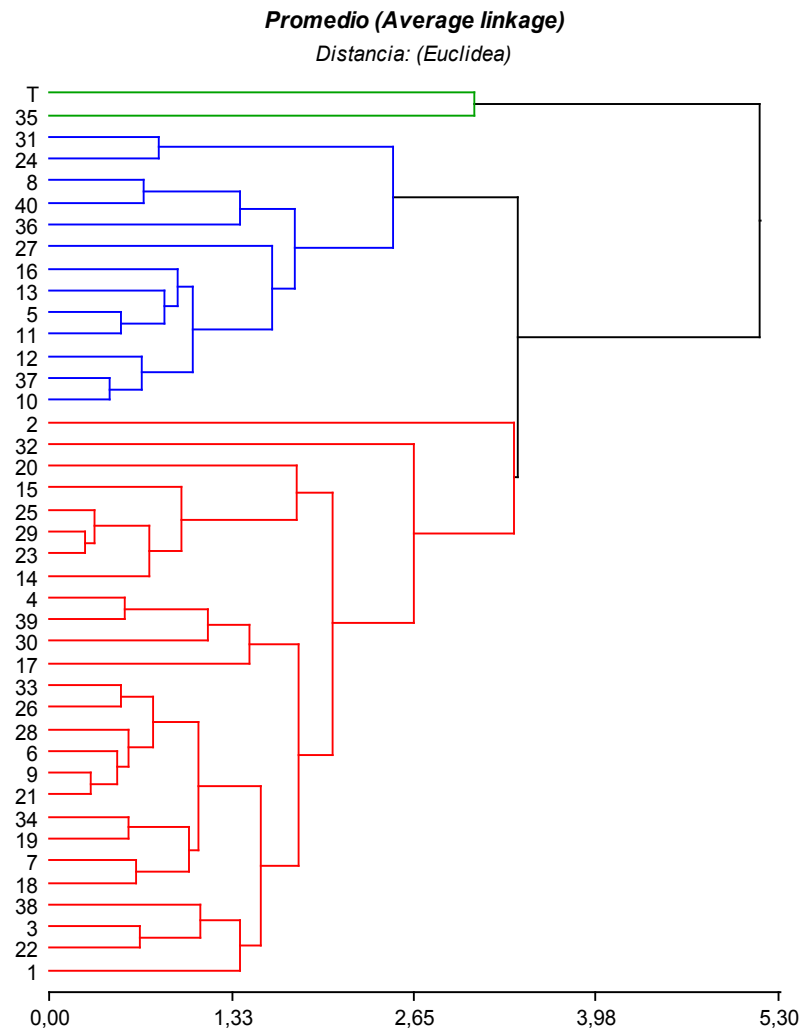


Figura 3.8: Dendrograma asociado al índice de daño de 40 aislamientos de *Alternaria* spp. en hojas de cinco cultivares de trigo. **Referencias:** rojo: ID alta; azul: ID media; verde: ID baja.

3.3.2 Pruebas de patogenicidad en semillas de trigo

El aislamiento que afectó en menor medida la germinación de la semilla fue el 11 perteneciente al grupo de especies *A. arborescens*. Las particularidades de cada variable analizada en relación a los aislamientos es el siguiente: en relación a la radícula debilitada y/o acortada, los aislamientos que produjeron mayor porcentaje de daño fueron el 21 y el 23, ambos pertenecientes al grupo de especies *A. infectoria*.

En relación al parámetro coleoptile debilitado y/o acortado los aislamientos que produjeron mayor porcentaje de daño fueron 21 y 25 pertenecientes al grupo de especies *infectoria*.

En cuanto a la aparición de síntomas tales como necrosis de radículas, los aislamientos que produjeron mayor daño fueron los 17 y 19, ambos pertenecientes al grupo de especies *arborescens*.

Por su parte, se distingue el aislamiento 35 (perteneciente al grupo de especies *A. alternata*) y los aislamientos 26 y 27 pertenecientes al grupo de especies *A. infectoria*, por inducir el mayor porcentaje de semillas manchadas respecto al resto de aislamientos analizados.

En relación a todas las variables involucradas en el análisis, los aislamientos que produjeron en general, un menor porcentaje de daño, fueron la 9, 34 y 39. La primera de ellas pertenece al grupo de especies *A. tenuissima* y las dos restantes al grupo de especies *alternata* (Figura 3.9).

En el Cuadro 3.13 se observa que con dos componentes se captura el 80% de la variabilidad total de la información.

Cuadro 3.13: Contribución de cada componente a la variabilidad total en el ACP.

Autovalores	Valor	Proporción	Prop.Acum.
1	2,94	0,59	0,59
2	1,05	0,21	0,80
3	0,70	0,14	0,94
4	0,20	0,04	0,98
5	0,10	0,02	1,00

En el cuadro 3.14, se observa que las variable SG se asocia negativamente con la primer componente y la variable SM se asocia positivamente con la segunda componente.

Cuadro 3.14: Correlaciones entre los componentes principales y las variables originales.

Variables	CP 1	CP 2
SG	-0,47	-0,62
SM	0,45	0,70
CDYA	0,92	-0,28
RDYA	0,94	-0,09
RN	0,88	-0,30

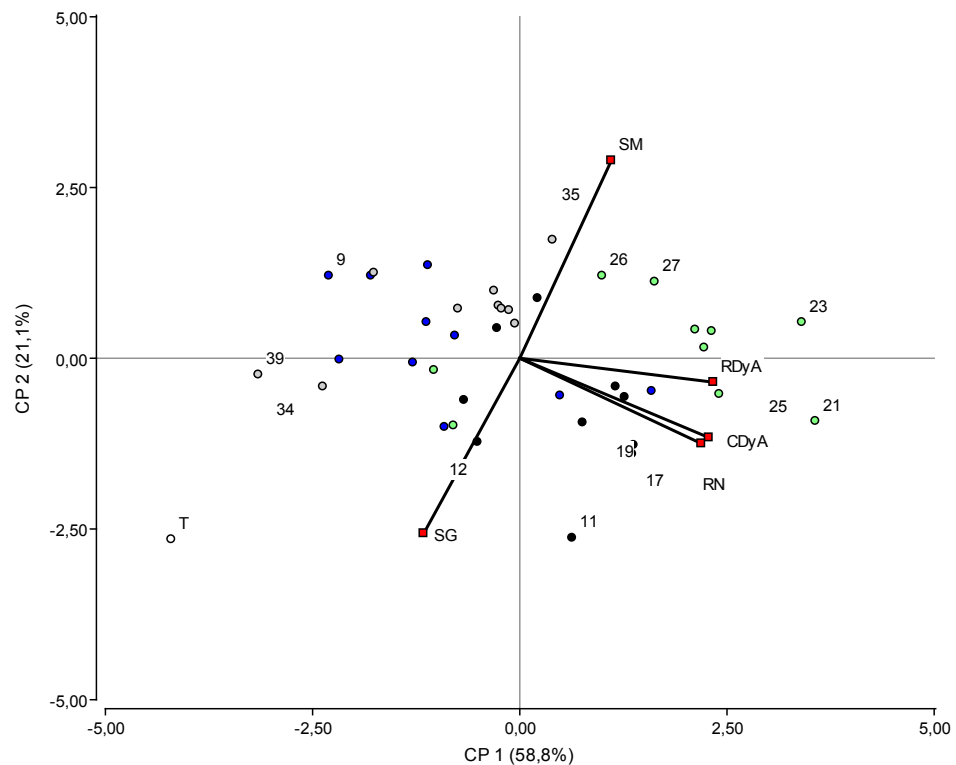


Figura 3.9: Biplot de las variables analizadas: semilla germinada (SG), semilla manchada (SM), radícula debilitada y acortada (RDyA), radícula necrosada (RN) y coleoptile debilitado y acortado (CDyA) en función de los aislamientos de *Alternaria* diferenciados según grupos (*A. tenuissima*, *A. arborescens*, *A. infectoria* y *A. alternata*) en los cinco cvs. de trigo. **Referencias:**

● *A. tenuissima* ● *A. arborescens* ● *A. infectoria* ● *A. alternata* ○ Testigo

Se observa en la Figura 3.10 que en relación a los cultivares, Baguette 9 y Buck SY 100 presentaron mayor porcentaje de semilla manchada. El cultivar Klein Chajá fue más afectado en relación al daño al coleoptile (mayor porcentaje de coleoptile debilitado y acortado). El mismo, también presentó alto porcentaje de radícula necrosada y radícula debilitada y acortada. El cultivar que presentó mayor porcentaje de germinación fue Buck SY 100.

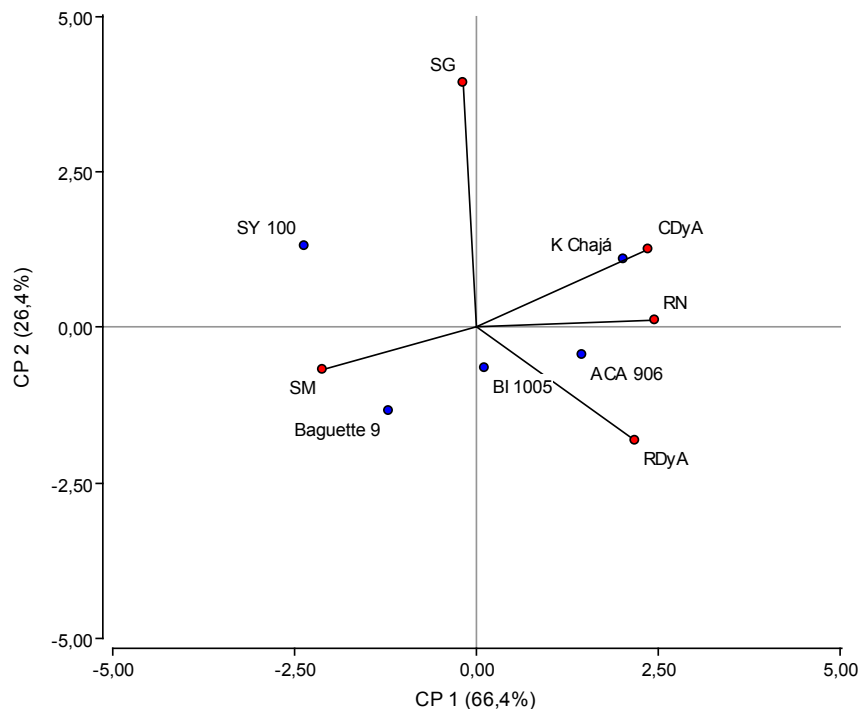


Figura 3.10: Biplot de las variables analizadas: semilla germinada (SG), semilla manchada (SM), radícula debilitada y acortada (RDyA), radícula necrosada (RN) y coleoptile debilitado y acortado (CDyA) en función de los cinco cultivares de trigo.

En el dendrograma asociado a incidencia del hongo en semillas (Figura 3.11) se visualizaron 3 grupos. El primero, de baja incidencia, solo contuvo al testigo. El grupo medio, incluyó mayormente aislamientos de los grupos de especies *A. arborescens* y *A. infectoria* (88%). En el grupo de mayor incidencia se encontró la mayoría de aislamientos de los grupos de especies *A. tenuissima* y *A. alternata* (78%).

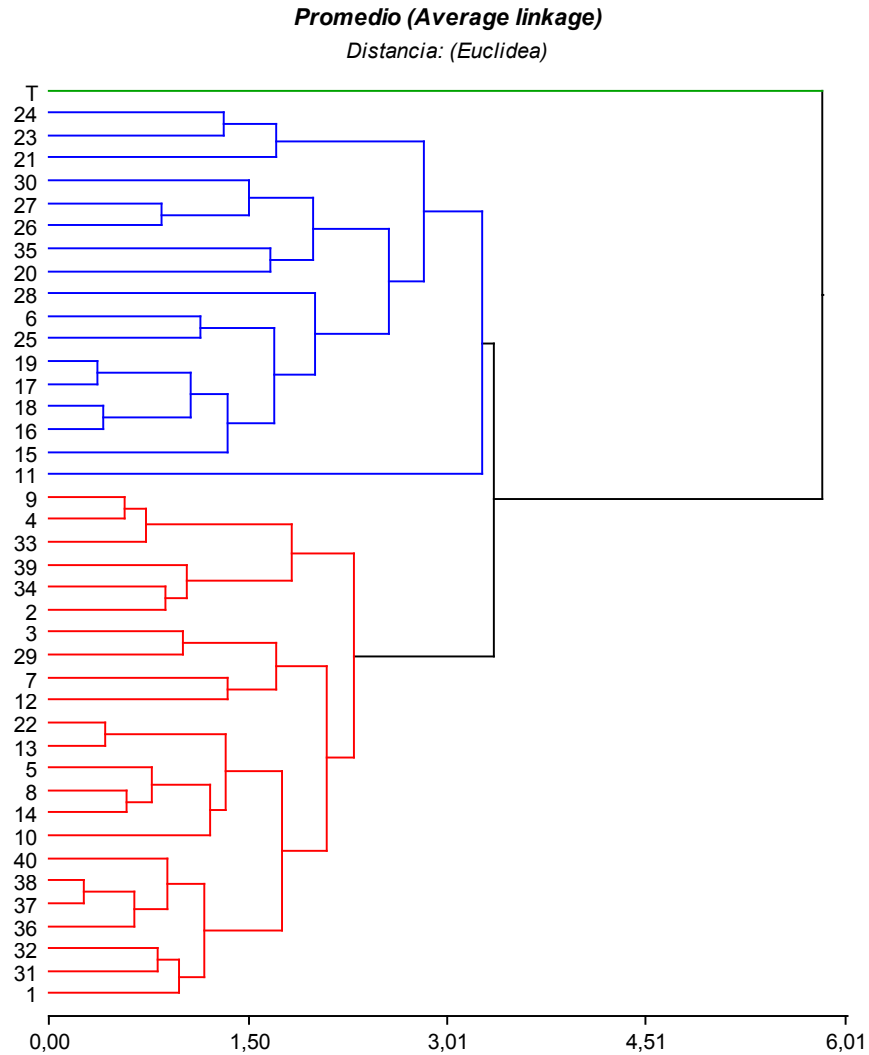


Figura 3.11: Dendrograma asociado a la incidencia de 40 aislamientos de *Alternaria* spp. en semillas de cinco cultivares de trigo

3.4 Determinación de los perfiles metabólicos del complejo de especies de *Alternaria* patógenas del trigo presentes en Argentina

Los grupos de especies de *Alternaria tenuissima*, *A. arborescens* y *A. alternata* produjeron los metabolitos alternariol, alternariol monometil éter, altenueno, altertoxina I y II, tentoxina y ácido tenuazoico. El grupo de especies *A. infectoria* produjo únicamente altertoxina I y II y tentoxina. (Cuadro 3.15).

Cuadro 3.15: Perfiles de producción de metabolitos secundarios de los grupos de especies de *Alternaria* aislados de semillas de trigo, medido en mg/kg.

<i>Alternaria</i> Grupo- especie	AOH	AME	ALT	ATX-I	ATX-II	TEN	TeA
<i>A. tenuissima</i>	7.51-18.66	2.91-6.28	1.11-7.01	0.38-6.69	0.13-2.45	0.40-3.11	18.57-53.02
<i>A. arborescens</i>	1.94-17.54	0.76-11.70	5.62-8.45	2.81-10.36	0.57-2.85	0.57-2.37	17.41-55.87
<i>A. infectoria</i>	-----	-----	-----	0.13-0.60	0.61-8.36	0.01-0.40	-----
<i>A. alternata</i>	0.17-19.83	0.78-8.05	0.05-9.86	0.41-8.90	0.57-8.90	0.11-2.84	43.99-50.01

Referencias: AOH=alternariol; AME=alternariol monometil eter; ALT= altenueno; ATX-I= altertoxina I; ATX-II= altertoxina II; TEN= tentoxina; TeA= ácido tenuazoico

Químicamente, el grupo de especies *A. infectoria* es muy diferente de otras especies de *Alternaria*, ya que produce metabolitos que no se encuentran en otros grupos de especies. El grupo de especies *A. infectoria* origina infectopyronas y novae-zelandinas. No hay reportes previos de producción de AOH ni TeA (Andersen *et al.* 2009). En el presente estudio el grupo de especies *A. infectoria* produjeron ATX-I, ATX-II y TEN, los cuales no están mencionados en bibliografía específica y requeriría su comprobación mediante el análisis de mayor número de aislamientos o la utilización de otras técnicas de determinación.

3.5 Caracterización morfológica y cultural de los aislamientos de *Pithomyces chartarum*

En las colonias monospóricas analizadas, el micelio presentó conidióforos pigmentados simples, poco diferenciados. Cada conidióforo produjo un conidio terminal; los conidios son equinulados o verrugosos, pigmentación oscura y 3-4 (en su mayoría 3) septos transversales. Todos los caracteres morfológicos de ambos aislamientos coincidieron con lo descrito para *Pithomyces chartarum* (Ellis 1971, Domsch *et al.* 2007). (Figura 3.12).



Figura 3.12: Colonias (a) y conidios (b), pertenecientes a *Pithomyces chartarum*.

3.6 Caracterización genética mediante un análisis molecular

El análisis molecular corroboró la identificación definida por la caracterización morfo-cultural previamente realizada. *Leptosphaerulina chartarum* es el teleomorfo de *Pithomyces chartarum*. En el Anexo 3 se puede observar el análisis del Genebank, que incluye la secuencia completa del fragmento estudiado. (Cuadro 3.16).

Cuadro 3.16: Análisis moleculares de un aislamiento de *P. chartarum*.

<i>Pithomyces</i>					GeneBank	
Especie	Aislamiento N°	Hospedante/ sustrato	Origen	Accesion Number	Especie	
<i>P. chartarum</i>	17	<i>T. aestivum</i> semilla	Argentina	JX442978	<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	

3.7 Análisis de la patogenicidad de los aislamientos de *P. chartarum* mediante inoculaciones en semillas de trigo

El análisis multivariado de componentes principales (ACP) permitió observar que con dos componentes se capta el 80% de la variabilidad total (Cuadro 3.17).

En el biplot (Figura 3.13) se detectó en relación a la variable semilla germinada (SG), que Klein Pantera es el cultivar con los más bajos porcentajes en ambos aislamientos, y Buck Guapo, cuando fue testeado con el aislamiento 2. Para la variable semilla manchada (SM), el cultivar más afectado fue Buck SY 100 con el aislamiento 1. Para coleoptile necrosado el cultivar más afectado fue Buck 55 CL en combinación con el aislamiento 1, y para la variable plántula debilitada el cultivar más afectado, para ambos aislamientos, resultó Klein Pantera.

Los cultivares que se destacan por presentar un mejor comportamiento y que se encuentran cercanos a los valores de los testigos fueron Meteoro, Buck Guapo y Klein Proteo.

En el Cuadro 3.17 se observa que con dos componentes se captura el 80% de la variabilidad total de la información.

Cuadro 3.17: Contribución de cada componente a la variabilidad total en el ACP.

Autovalores	Valor	Proporción	Prop Acum
1	2,28	0,57	0,57
2	0,91	0,23	0,80
3	0,67	0,17	0,97
4	0,14	0,03	1,00

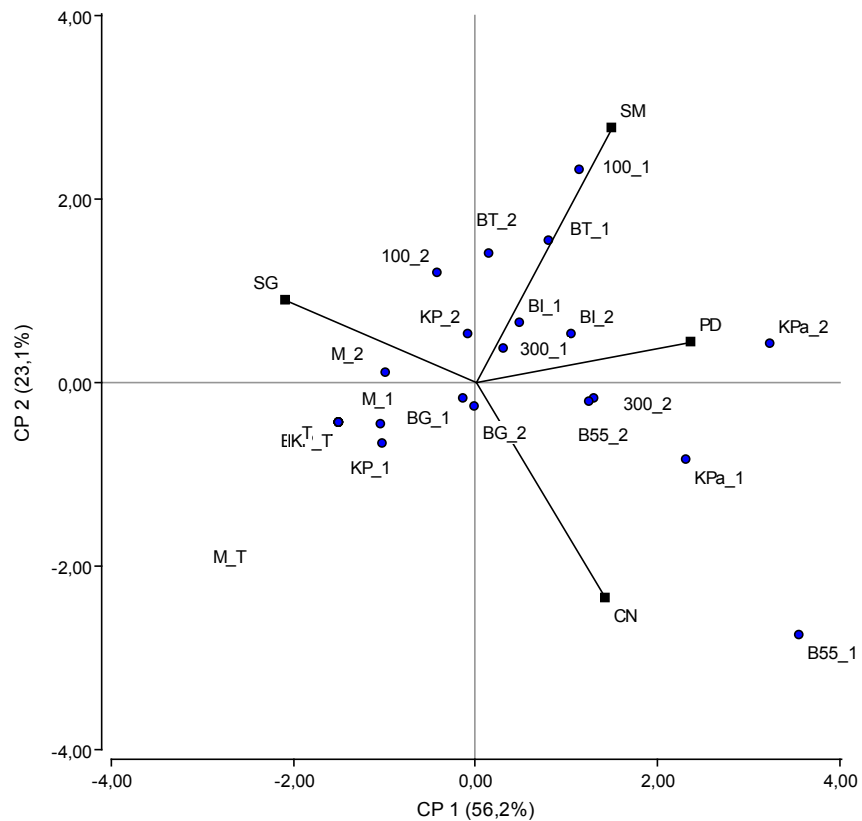


Figura 3.13: Biplot de las variables analizadas: semilla germinada (SG), semilla manchada (SM), coleoptile necrosado (CN) y plántula debilitada (PD) en función de los aislamientos de *Pithomyces chartarum* en los nueve cultivares de trigo.

Referencias: M: Meteoro, BT: Buck Taita, 100: Buck SY 100, 300: Buck SY 300, BG: Buck Guapo, B55: Buck 55 CL, BI BioINTA 1004, KP: Klein Proteo, KPa: Klein Pantera.

En el dendrograma (Figura 3.14) se visualizaron tres grupos: el primero de ellos agrupó a los testigos con los cultivares menos afectados: Meteoro y Buck Guapo en ambos aislamientos; y Klein Proteo en relación a la aislamiento 1. El grupo central, con susceptibilidad media, agrupó a la mayoría del resto de cultivares para ambos aislamientos. El grupo más susceptible está formado únicamente por el cultivar Buck SY 100 en combinación con el aislamiento 1.

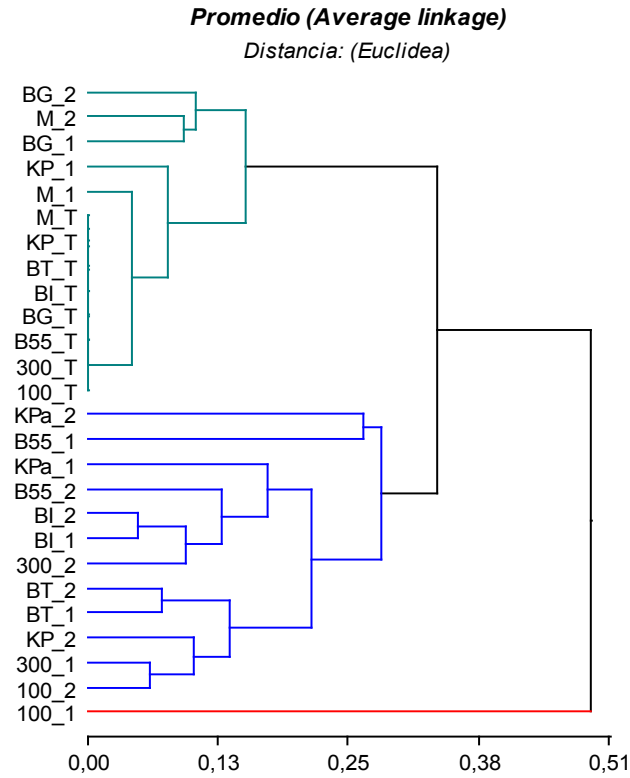


Figura 3.14: Dendrograma de las variables semilla germinada (SG), semilla manchada (SM), coleoptile necrosado (CN) y plántula debilitada (PD) en función de los aislamientos de *Pithomyces chartarum* en los nueve cultivares de trigo.

Referencias: M: Meteoro, BT: Buck Taita, 100: Buck SY 100, 300: Buck SY 300, BG: Buck Guapo, B55: Buck 55 CL, BI BioINTA 1004, KP: Klein Proteo, KPa: Klein Pantera.

3.7.1 Estadísticos descriptivos para *P. chartarum* en relación a las variables analizadas

Estadísticos descriptivos para *P. chartarum* en relación a la variable semilla germinada

Según el porcentaje de semilla germinada, el cultivar que fue más afectado, con menor porcentaje de germinación es Klein Pantera (Cuadro 3.18).

Cuadro 3.18: Estadísticos descriptivos para *P. chartarum* en relación a la variable semilla germinada (SG) para los cultivares de trigo ensayados.

<i>P. chartarum</i>		Cultivar								
	SG	Meteoro	Taita	SY 300	SY 100	Guapo	55 CL	BI 1004	Proteo	Pantera
Aislamiento 1	Media	0,98	0,97	0,98	0,98	0,94	0,88	0,97	1	0,85
	DE	0,03	0,06	0,04	0,04	0,08	0,09	0,04	0	0,05
Aislamiento 2	Media	0,99	1	0,95	1	0,89	0,86	0,93	0,97	0,82
	DE	0,03	0	0,04	0	0,12	0,25	0,06	0,03	0,1
Testigo	Media	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	DE	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Referencias: DE: desvío estándar.

Estadísticos descriptivos para *P. chartarum* en relación a la variable semilla manchada

En relación al porcentaje de semilla manchada, el cultivar que fue más afectado, con mayor porcentaje es SY 100 en ambos aislamientos, y Taita y SY 300 en relación al aislamiento 1. (Cuadro 3.19)

Cuadro 3.19: Estadísticos descriptivos para *P. chartarum* en relación a la variable semilla manchada (SM) para los cultivares de trigo ensayados.

<i>P. chartarum</i>		Cultivar								
	SM	Meteoro	Taita	SY 300	SY 100	Guapo	55 CL	BI 1004	Proteo	Pantera
Aislamiento 1	Media	0,01	0,45	0,37	0,63	0,11	0,22	0,24	0,07	0,14
	DE	0,02	0,36	0,16	0,19	0,08	0,06	0,13	0,02	0,02
Aislamiento 2	Media	0,14	0,4	0,3	0,38	0,16	0,19	0,25	0,28	0,29
	DE	0,02	0,09	0,09	0,07	0,03	0,09	0,08	0,13	0,11
Testigo	Media	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	DE	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Referencias: DE: desvío estándar.

Estadísticos descriptivos para *P. chartarum* en relación a la variable coleoptile necrosado

En relación al porcentaje de coleoptile necrosado, el cultivar que fue más afectado, con mayor porcentaje es Buck 55 CL en relación al aislamiento 1. (Cuadro 3.20)

Cuadro 3.20: Estadísticos descriptivos para *P. chartarum* en relación a la variable coleoptile necrosado (CN) para los cultivares de trigo ensayados.

<i>P. chartarum</i>		Cultivar								
	CN	Meteoro	Taita	SY 300	SY 100	Guapo	55 CL	BI 1004	Proteo	Pantera
Aislamiento 1	Media	0	0	0,05	0	0	0,22	0	0,04	0,05
	DE	0	0	0,07	0	0	0,13	0	0,08	0,07
Aislamiento 2	Media	0	0	0,07	0	0	0,01	0	0,01	0
	DE	0	0	0,1	0	0	0,02	0	0,03	0
Testigo	Media	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	DE	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Referencias: DE: desvío estándar.

Estadísticos descriptivos para *P. chartarum* en relación a la variable plántula debilitada

En relación al porcentaje de plántula debilitada, el cultivar que fue más afectado, con mayor porcentaje es Klein Pantera en ambos aislamientos. (Cuadro 3.21)

Cuadro 3.21: Estadísticos descriptivos para *P. chartarum* en relación a la variable plántula debilitada (PD) para los cultivares de trigo ensayados.

<i>P. chartarum</i>		Cultivar								
	PD	Meteoro	Taita	SY 300	SY 100	Guapo	55 CL	BI 1004	Proteo	Pantera
Aislamiento 1	Media	0,04	0,16	0,06	0,17	0,08	0,25	0,18	0	0,26
	DE	0,05	0,11	0,04	0,07	0,07	0,14	0,02	0	0,07
Aislamiento 2	Media	0,01	0,12	0,16	0,04	0	0,14	0,2	0,07	0,38
	DE	0,02	0,09	0,06	0,04	0	0,05	0,12	0,08	0,11
Testigo	Media	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	DE	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Referencias: DE: desvío estándar.

Dado que el análisis de estadísticos descriptivos muestra, en relación a todas las variables medidas, que los testigos presentaron un desvío estándar igual a cero, los mismos no serán incluidos en futuros análisis que se presentan.

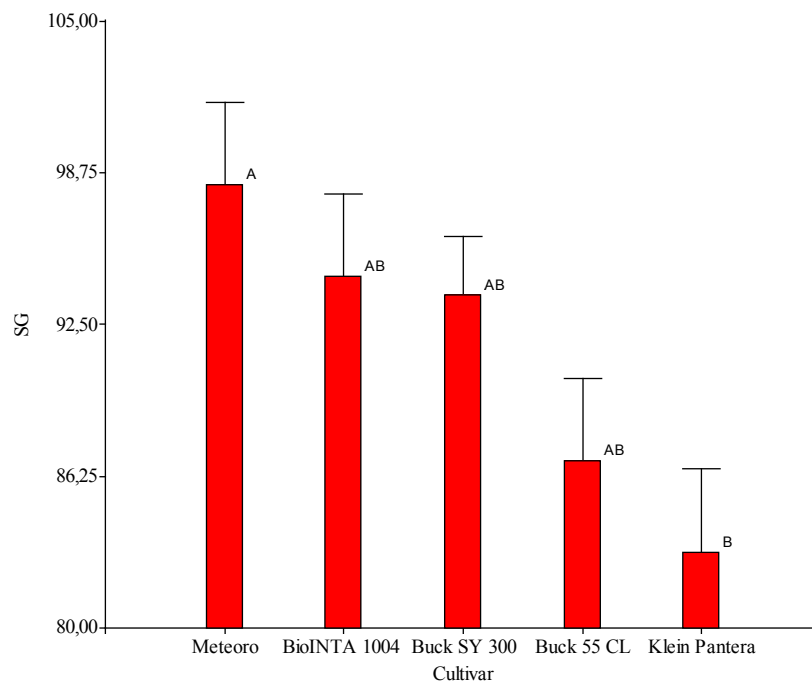
Se realizó un análisis por variable, descartando los cultivares de trigo que tuvieron desvío estándar cero.

3.7.2 Análisis por variable

Variable semilla germinada

Se analizaron los cultivares Meteoro, Buck SY 300 Buck 55 CL, BioINTA 1004 y Klein Pantera. Dado que se detectó heterogeneidad de varianzas se utilizó un análisis de varianza empelando modelos mixtos. No se detectó interacción entre cultivares y aislamientos ($p=0,6838$) ni diferencias entre los dos aislamientos ($p=0,3511$), pero si entre cultivares ($p=0,0002$). Ver Anexo 4.

Se distingue en la comparación de medias realizada que el cultivar Klein Pantera difirió significativamente del cultivar Meteoro. Ver Figura 3.15.



Medias con la misma letra no difieren entre sí. ($p < 0,05$)

Figura 3.15: Medias, desvíos estándar y prueba de Tukey en relación a la variable semilla germinada (SG) para *P. chartarum*.

Variable semilla manchada

El análisis realizado para los nueve cultivares analizados de normalidad y homogeneidad, mostró heterogeneidad para la variable y cultivares testeados.

A partir del ANOVA se detectó interacción cultivar-aislamiento ($p=0.001$). Se efectuó un análisis entre aislamientos dentro de cada cultivar, detectándose diferencias en Meteoro ($p<0.0001$), SY 100 ($p=0.0165$), Klein Proteo ($p=0.0017$) y Klein Pantera ($p=0.0118$), como puede apreciarse en la Figura 3.16 y el Anexo 4.

En el gráfico 3.16 se visualiza la diferencia significativa en relación al manchado de semilla en los cultivares de trigo Meteoro, SY 100, Klein Proteo y Klein Pantera. El aislamiento 1 produjo mayor manchado de semilla en SY 100, en cambio el aislamiento 2 produjo mayor manchado de semilla en Meteoro, Klein Proteo y Klein Pantera.

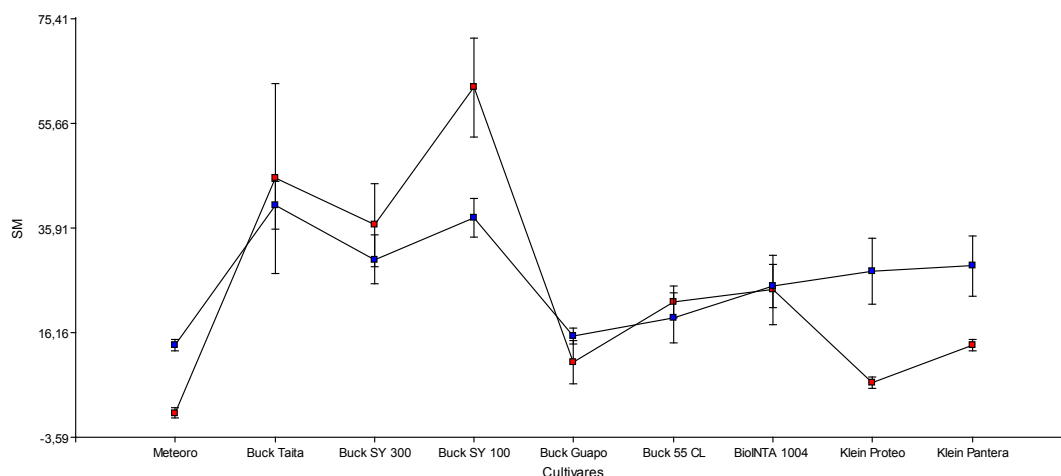


Figura 3.16: Medias y desvíos estándar para ambos aislamientos de *P. chartarum* y cultivares de trigo para la variable semilla manchada. Referencias: rojo cepa 1, azul cepa2.

Análisis para la variable coleoptile necrosado

Se analizaron los cultivares SY 100, Buck CI 55 y Klein Proteo con ambos aislamientos, obteniéndose normalidad y homogeneidad.

Se detectó interacción cultivar-aislamiento ($p=0.0263$). Se efectuó un análisis entre aislamientos dentro de cada cultivar, detectándose diferencias sólo en el cultivar Buck CI 55, al cual el aislamiento 2 le produjo mayor porcentaje de daño en relación a la variable estudiada. Ver Figura 3.17 y Anexo 4.

Como puede observarse en la Figura 3.17, el aislamiento 1 produjo en Buck CI 55 un daño marcadamente mayor a las semillas de trigo, en relación al coleoptile necrosado.

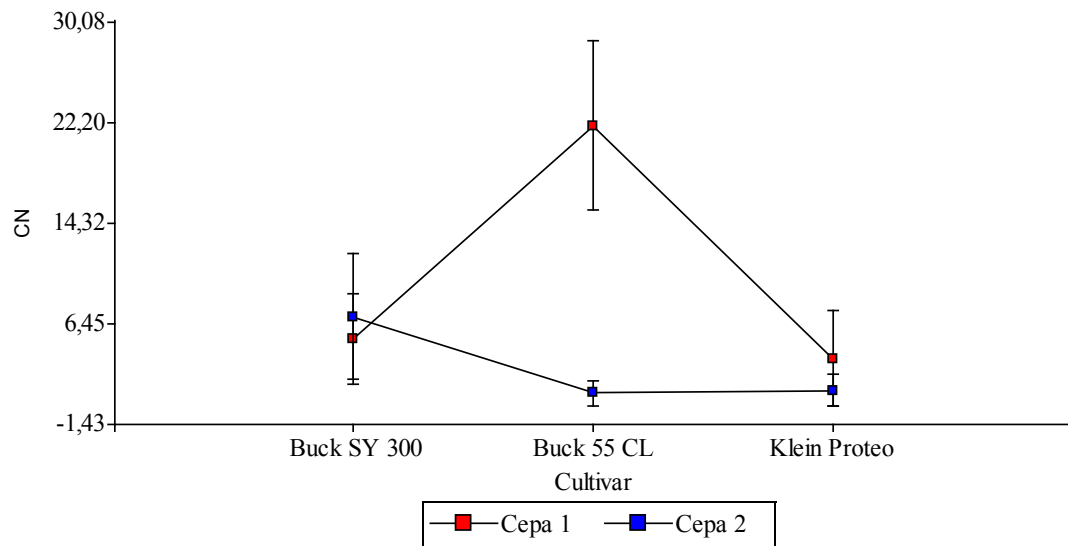


Figura 3.17: Medias y desvíos estándar de la variable coleoptile necrosado para *P. chartarum* en los cv. estudiados.

Análisis para la variable plántula debilitada

Este análisis excluye al testigo, a los cultivares Buck Guapo y Klein Proteo. El ANOVA evidencia interacción cultivar-aislamiento ($p=0.0179$). Sólo en los casos de los cultivares SY 100 ($p=0.0275$) y Klein Pantera ($p=0.0498$), se ven diferencias significativas entre los aislamientos 1 y 2 (Anexo 4 y Figura 3.18).

Como se observa en la Figura 3.18 el comportamiento de los aislamientos es diferencial. En el caso del cultivar SY 100, el que causó mayor daño en relación a la variable analizada con diferencias significativas fue la aislamiento 1, y en el cultivar Klein Pantera el aislamiento que produjo mayor porcentaje de plántula debilitada fue el 2.

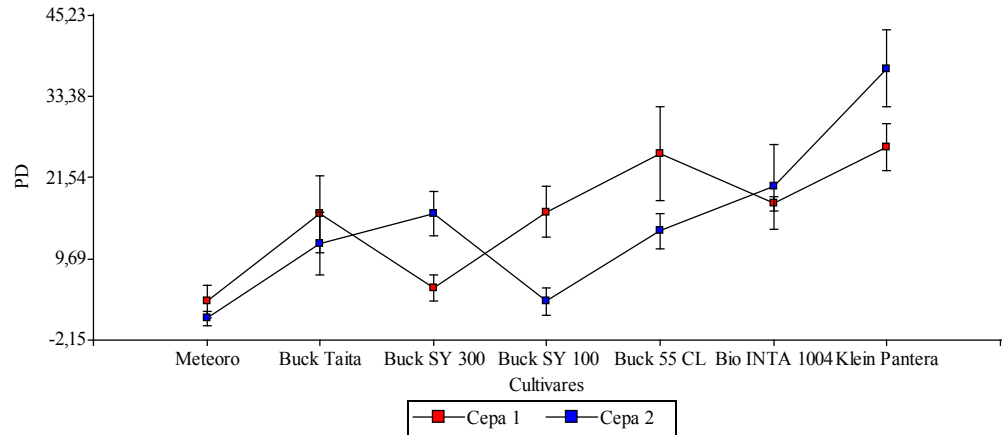


Figura 3.18: Medias y desvíos estándar de la variable plántula debilitada por *P. chartarum*.

3.8 Análisis de metabolitos secundarios asociados a *Pithomyces chartarum*

Pithomyces chartarum produjo las toxinas alternariol (AOH) y alternariol monometil éter (AME).

Cuadro 3.22: Perfil de producción de metabolitos secundarios (mg/kg) de *P. chartarum* aislado de semillas de trigo.

Especie	AOH	AME	ALT	ATX-I	ATX-II	TEN	TeA
<i>Pithomyces chartarum</i>	0.20	0.24	----	----	----	----	----

Referencias: AOH=alternariol; AME=alternariol monometil eter; ALT= altenueno; ATX-I= altertoxina I; ATX-II= altertoxina II; TEN= tentoxina; TeA= ácido tenuazoico

Capítulo 4

DISCUSIÓN

En todas las zonas trigueras tradicionales estudiadas se corroboró la presencia de los diferentes grupos de *Alternaria* en semillas de trigo de diferentes zonas agroecológicas de Argentina. Además, se observó una alta incidencia en todos los grupos de especies, con mayor relevancia del grupo de especies de *Alternaria infectoria*.

Tradicionalmente en Argentina la semilla se ha asociado a la presencia de *Alternaria alternata* causando daños (Sisterna & Sarandon 2005, Miravalles *et al.* 2008). Nuevos aislamientos obtenidos por Perelló *et al.* (2008), Perelló & Larrán (2013) mostraron la presencia de otros grupos de especies, especialmente *A. infectoria*. Esto muestra que existe en la actualidad una nueva composición de grupos de especies de *Alternaria* en Argentina que deben ser estudiados con mayor detalle por su posible potencial toxicogénico y patogénico.

La caracterización molecular de los grupos de aislamientos de *Alternaria* (Mercado Vergnes *et al.* 2006, Pavon *et al.* 2012b, Stenglein & Balatti, 2006) fueron coincidentes con los resultados de estudios taxonómicos basados en la morfología de los conidios (Simmons 2007).

La evidente homoplasia morfológica del género *Alternaria* (Lawrence *et al.* 2013) no permitiría identificar con certeza una especie de *Alternaria* en particular, sino los rasgos de un grupo de especies dada, extensivo para los aislamientos analizados en Argentina. La técnica de PCR resulta más rápida y exacta para fines de caracterización de aislamientos, pero necesita equipamiento y reactivos más complejos, a diferencia de los requeridos por las técnicas tradicionales que pueden ser realizados en cualquier laboratorio convencional. No obstante para confirmar una especie se debería realizar una técnica molecular complementaria.

Dugan & Peever (2002) en su trabajo elijen un enfoque morfológico. Estos autores realizan una caracterización de varias especies de *Alternaria* patógenas en trigo y especies afines utilizando técnicas morfológicas y culturales (Simmons 1992, 1995, Roberts *et al.* 2000) y también utilizan el medio de cultivo DRYES (Anderson & Thrane 1996). Luego realizan un análisis estadístico generando una clave para diferenciación (mediante caracteres morfo-culturales) de las especies de *Alternaria* testeadas en su ensayo y presentes en gramíneas. Aclaran que para otros estudios, otras técnicas (moleculares,

fisiológicas, datos fitopatológicos o conceptos filogenéticos de especies) podrían resultar más útiles.

En Argentina existen reportes previos de trabajos utilizando técnicas convencionales para identificación de especies de *Alternaria*, basadas en trabajos de Simmons (2007, 1994, 1986, 1981). Perelló *et al.* (2008a) toman muestras con escudete negro en la provincia de Buenos Aires y realizan blotter y agar test, resultando un 37% de incidencia de *Alternaria*. Luego de los ensayos de identificación tradicionales concluyen que mayoritariamente estos hongos pertenecían al grupo de especies *A. infectoria*, cuando en Argentina hasta ese momento el escudete negro se había asociado al grupo de especies de *A. alternata*. En hojas de trigo a partir de muestras sintomáticas tanto Perelló & Sisterna (2005) como Perelló *et al.* (1996) por medio de estudios morfológicos, llegan a determinar *A. triticina* y *A. triticimaculans* respectivamente. También se utilizó otro enfoque, el uso de técnicas bioquímicas-moleculares. Perelló *et al.* (2003) analizaron los patrones isoenzimáticos de aislamientos de *A. infectoria* asociados a tizones foliares del trigo. Examinaron polimorfismo en 20 aislamientos utilizando la técnica de electroforesis de proteínas e isoenzimas y comprobaron la existencia de polimorfismos para α -esterasas, fosfatasa y peroxidasas. Se utilizó esta técnica ya que es más sencilla y económica que la molecular.

En el caso de técnicas moleculares, Pavón *et al.* (2010) usa PCR para realizar una rápida detección del ADN de *Alternaria* e identificación de especies, basado en cebadores con el objetivo de amplificar el gen Alt a 1. Para ello, en una primera etapa realiza una PCR dúplex con un cebador Dir5cAlta1- Inv4Alta1 que detecta todas las especies de *Alternaria* y con el cebador 18Sfweu- 18Srveu que detecta eucariontes. Luego en una segunda etapa, la identificación de los grupos de especies de *Alternaria* se realiza mediante una PCR semi anidada. La especificidad de los cebadores ha sido probada tanto en cultivos del género como de géneros afines. En este ensayo logra separar entre otras, *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens* y *A. infectoria*. Sería interesante la realización de un estudio similar incluyendo *A. triticina*, perteneciente al grupo de especies *A. infectoria*, patógena de trigo, presente en Argentina y de interés cuarentenario para varios países.

Lawrence *et al.* (2013) realizaron un estudio con un acercamiento filogenético molecular para llegar a una resolución sistemática. Ellos utilizaron 176 muestras de 10

géneros y analizaron 10 *loci* de ADN codificantes de proteínas. Los análisis filogenéticos de 5 *loci* mostraron 8 distintos linajes asexuales de *Alternaria*. El grupo de especies de *A. infectoria* fue más cercano a otras especies con teleomorfo conocido. Ellos proponen nuevos grupos o secciones y dejar afuera al grupo de especies de *A. infectoria*, condicionados a estudios más amplios. Esta información obtenida se contrapone con los caracteres morfológicos utilizados hasta el momento para clasificación (Simmons 2007). La justificación es que los 5 *loci* finalmente utilizados (*gpd*, *Alt a 1*, *actina*, *ATPasa* de membrana plasmática y *calmodulina*) poseen una utilidad filogenética alta y producen una hipótesis fuertemente sustentada con respecto a la relación evolutiva entre *Alternaria* y géneros cercanos relacionados.

Se comprobó la patogenicidad de los aislamientos de *Alternaria* en hojas de trigo para los grupos de especies caracterizados hasta el presente.

En relación a la incidencia, los aislamientos que produjeron mayor daño en general frente a todos los cultivares utilizados fueron el 15 perteneciente al grupo de especies *A. arborescens* y aislado de Rafaela (Región I), el 9 perteneciente al grupo de especies *A. tenuissima* y originario de La Dulce (Región VI) y el 7 perteneciente al grupo de especies *A. tenuissima* y aislado de Manfredi (Región V Norte).

En el dendrograma de incidencia se demostró que no existe asociación entre grupo de especies de *Alternaria* con la incidencia en hojas de trigo para los cultivares y aislamientos utilizados. Además confirma que los aislamientos que producen mayor daño son los 7, 9 y 15.

La aislamiento con mayor índice de daño en relación a los cultivares Klein Chajá, BioINTA 1005 y Baguette 9 fue el 2, aislado de Chacabuco (Región II Sur) perteneciente al grupo de especies *A. tenuissima*. El aislamiento que presentó el mayor índice de daño en general frente a todos los cultivares utilizados fue el 14, aislado de Pergamino (Región II Norte) perteneciente al grupo de especies *A. arborescens*.

En cambio, el aislamiento con menor índice de daño en los cultivares Buck SY 100 y ACA 906 fue la 35, aislada de Paraná (Región III) perteneciente al grupo de especies *A. alternata*. Y frente a todos los cultivares utilizados, los aislamientos con comportamiento similar al testigo fueron la 24, perteneciente al grupo de especies *A. infectoria* y aislado de La Dulce (Región IV), el 31 perteneciente al grupo de especies *A. alternata* y aislado de

Manfredi (Región V Norte) y el 36 perteneciente al grupo de especies *A. alternata* y aislado de Rafaela (Región I).

La mayoría de los trabajos existentes sobre patogénesis en trigo estudiaron los grupos de especies de *Alternaria alternata* y *A. infectoria* (Perelló & Sisterna 2005, Perelló *et al.* 1996, Joshi & Miedaner 2003, Chaurasia *et al.* 1999).

En el dendrograma presentado en resultados para índice de daño, si bien en todos los agrupamientos hay representantes de todos los grupos de especies, en el grupo de mayor ID se observa más cantidad de aislamientos de los grupos *A. tenuissima* e *A. infectoria*.

Esto se contrapone con los resultados previos de Mercado Vergnes *et al.* (2006), en los cuales se realizó un ensayo de patogenicidad en Bélgica, en plantas de trigo al estado de cuarta hoja y espigazón, con 15 cultivares de trigo y 14 aislamientos de *Alternaria triticina*, *A. arborescens*, *A. alternata* y *A. tenuissima*. Luego de 7 días del asperjado de conidios (20.000 con/ml), observaron la segunda y tercera hoja en el ensayo de plantas a cuarta hoja, y la penúltima y hoja bandera en el ensayo de espigazón. Sólo produjeron síntomas los aislamientos de *Alternaria triticina* perteneciente al grupo de especies *A. infectoria*. Esto puede ser debido a las condiciones del ensayo y a que los cultivares y aislamientos difieren de la población presente en Argentina. Sería interesante proponer en un foro internacional la estandarización de las condiciones de análisis para este patosistema a los fines comparativos de los resultados.

En Argentina, Perelló *et al.* (1996) realizaron un test de patogenicidad en invernáculo con condiciones controladas de temperatura, luz y humedad. El objetivo era testear aislamientos de *A. triticimaculans* (perteneciente al grupo *A. infectoria*) y completar los postulados de Koch ante una nueva sintomatología. Hallaron que los tres cultivares utilizados (Buck Ombú, Buck Palenque y Buck Poncho), asperjados con la solución de conidios ($1,5 \times 10^6$ con/ml), mostraron síntomas a partir de los tres días después de la inoculación. Con el progreso de la enfermedad, todas las plantas de trigo inoculadas desarrollaron síntomas idénticos a los observados a campo.

Perelló & Sisterna (2005) a partir de hojas de trigo con síntomas colectadas en la provincia de Buenos Aires, realizaron aislamientos, caracterización morfológica y luego inoculación en invernáculo en cultivares susceptibles en macollaje y encañazón. Luego de

10 días de asperjada la solución de inóculo (2×10^5 con/ml), aparecieron síntomas típicos de tizón foliar en las plantas inoculadas y *A. triticina* fue reaislada de las lesiones.

Respecto a la patogenicidad de *Alternaria* en semillas de trigo se demostró que existen aislamientos pertenecientes a todos los grupos de especies de *Alternaria* patógenos en semillas de trigo en todos los cultivares testeados, que produjeron distintos daños.

Los aislamientos 26 y 35, ambos aisladas de Paraná (Región III) pertenecientes al grupo de especies *A. infectoria* y *A. alternata* respectivamente, junto con el aislamiento 27 aislado de Manfredi (Región V Norte) perteneciente al grupo de especies *A. infectoria* produjeron mayor porcentaje de semilla manchada.

Los resultados obtenidos concuerdan parcialmente con los de Perelló *et al* (2008a) que llevaron a cabo un test de patogenicidad, tanto en blotter como en agar inoculando una suspensión conidial (2×10^5 con/ml) del grupo de especies *A. infectoria*. Las semillas infectadas presentaron síntomas necróticos y las plántulas emergidas resultaron débiles y con vigor reducido. Se observó un aumento de la incidencia del grupo de especies *A. infectoria* en relación al escudete negro, que antes estaba circunscripto a *A. alternata*.

En el presente trabajo, los aislamientos que produjeron mayor porcentaje de radícula debilitada y/o acortada tanto como coleoptile necrosado y/o acortado fueron el 21 aislado de Chacabuco (Región II Sur) y el 23 aislado de Balcarce (Región IV), ambos pertenecientes al grupo de especies *A. infectoria*.

Los aislamientos 11 originario de La Dulce (Región IV), 17 aislado de Llavallol (Región II S) y 19 aislado de Bordenave (Región V Sur) produjeron mayor porcentaje de radícula necrosada. Todos los aislamientos pertenecen al grupo de especies *A. alternata*.

Esto es coincidente con lo descripto para escudete negro, cuyo agente causal ha sido tradicionalmente asociado a *A. alternata* (Andersen *et al.* 2002, Bhowmik 1969, Miravalles *et al.* 2008, Sisterna & Sarandón 2005). Y también con los últimos hallazgos en Argentina de la asociación del grupo especie *Alternaria infectoria* con el escudete negro por Perelló *et al.* (2008a). Estos grupos no sólo producen manchado de semilla sino también daños en plántulas, como radícula y coleoptile debilitados, necrosados y/o acortados, los cuales podrían retrasar o anular la emergencia de estas plántulas, produciendo su muerte prematura. Dugan & Lupien (2012) en un estudio realizado en Estados Unidos testeando semillas asintomáticas y el nudo de varias gramíneas incluyendo trigo, concluyeron que los

hongos dematiáceos predominantes fueron *Cladosporium* y *Alternaria*. Dentro de este último *A. infectoria* fue la especie más frecuentemente aislada de semillas. La presencia de *A. tenuissima* fue común y la de *A. alternata* poco frecuente.

Los aislamientos menos virulentos fueron el 9 perteneciente al grupo de especies *A. tenuissima* que fue aislado de La Dulce (Región IV), 34 aislado de Los Hornos (Región II S) y 39 aislado de Balcarce (Región IV). Estos dos últimos pertenecen al grupo de especies *A. alternata*.

También de los resultados generales del dendrograma se desprende que, dentro de los aislamientos y cultivares estudiados, predominan aislamientos de los grupos de especies *A. tenuissima* y *A. alternata* en el grupo que produce mayor daño a las semillas de trigo, mientras que entre las que producen menor daño preponderan aislamientos de los grupos de especies *A. arborescens* e *A. infectoria*. Debemos tomar en cuenta que el dendrograma se construye en base al promedio de todos los aislamientos en todos los cultivares. Si observamos puntualmente, los aislamientos que produjeron mayor porcentaje de radícula debilitada y /o acortada y coleoptile debilitado fueron del grupo de especies *A. infectoria*. Los aislamientos que produjeron mayor porcentaje de semilla manchada pertenecen al grupo de especies *A. infectoria* y *A. alternata*. En relación al porcentaje de radícula necrosada los más dañinos fueron aislamientos del grupo de especies *A. arborescens*.

Se comprobó la patogenicidad de *Pithomyces chartarum* en semillas de trigo. *P. chartarum* produjo disminución de la germinación en semillas, especialmente en el cultivar Klein Pantera, y el aislamiento 1 un manchado intenso en Buck SY 100. Se observaron plántulas debilitadas en Klein Pantera y coleoptile necrosado, siendo más severo el daño en Buck 55 cuando se inoculó el aislamiento 1, comparado con los testigos.

Los cultivares de mejor comportamiento frente a ambos aislamientos fueron Buck Guapo y Meteoro, mientras que Klein Proteo presentó buen comportamiento al aislamiento 1. El cultivar más susceptible fue Buck SY 100 cuando fue inoculado con el aislamiento 1.

En relación con la variable semilla germinada (SG) se observó que el cultivar Klein Pantera (83,5% SG) difirió significativamente de Meteoro (98,5% SG), presentando una disminución de la germinación. Buck SY 100 presentó el mayor porcentaje de germinación, 99% SG. El resto de los cultivares presentó valores intermedios entre estos valores.

Para semilla manchada (SM) los cultivares que presentaron diferencias significativas para los dos aislamientos fueron Meteoro, Buck SY 100, Klein Proteo y Klein Pantera. El aislamiento 1 produjo mayor porcentaje de SM que el aislamiento 2 en Meteoro. En cambio para Buck SY 100, Klein Proteo y Klein Pantera el aislamiento 2 fue el que produjo mayor manchado de semilla.

Para la variable coleoptile necrosado (CN) en el cultivar Buck 55 CL el aislamiento 1 produjo mayores síntomas que el aislamiento 2, con diferencias significativas. En cambio sobre Buck SY 300 y Klein Proteo ambos aislamientos produjeron similar daño sin mostrar diferencias. El resto de los cultivares no presentaron ningún daño con ambos aislamientos, excepto Klein Pantera un 5% con el aislamiento 1.

En el caso de plántula debilitada (PD) Buck SY 100 presentó un porcentaje significativamente mayor de daño con el aislamiento 1. En cambio Klein Pantera tuvo significativamente mayor cantidad de plántulas debilitadas con el aislamiento 2.

Los cultivares Klein Proteo y Klein Pantera son más susceptibles al aislamiento 2 ya que los afecta en mayor medida en dos variables importantes para el desarrollo de la planta de trigo (SM, CD y SM, PD respectivamente). Luego Buck SY 100 es afectado tanto por el aislamiento 1(PD) como por el aislamiento 2 (SM).

Tóth *et al.* (2007) en su ensayo de patogénesis inoculando hojas de trigo con una suspensión de esporas de *P. chartarum* encontraron diferencias importantes en los síntomas producidos en los diferentes cultivares utilizados. En este estudio a nivel de semilla y de plántula se encontraron diferencias significativas no sólo entre cultivares sino también entre aislamientos dentro de un cultivar.

Respecto a los perfiles metabólicos analizados, todos los aislamientos seleccionados de especies grupo *Alternaria tenuissima*, *A. arborescens* y *A. alternata* produjeron AOH, AME, ALT ATX-I, ATX II, TEN y TeA y por lo expuesto no podrían usarse los perfiles metabólicos de estos grupos como carácter quimiotaxonómico para su diferenciación.

Alternaria tenuissima produjo las menores cantidades tanto de ATX- I y II (0,38 mg/kg y 0,13 mg/kg respectivamente). *A. arborescens* produjo las menores cantidades de AME y de TeA (0,76 mg/kg y 17,41 mg/kg). *A. alternata* produjo tanto los menores como los mayores valores en las siguientes: AOH, ALT, TEN y también las mayores cantidades de ATX-II. *A. arborescens* produjo las mayores cantidades de AME, ATX-I y TeA.

Andersen *et al.* (2005) demostraron que los aislamientos de *A. alternata* provenientes de India utilizados para su ensayo no produjeron TeA, pero si ALT, TEN, ATX-I, AOH, AME, en contraposición de los aislamientos estudiados que producen TeA.

Logrieco *et al.* (2009) describen al TeA como un compuesto que puede actuar tanto como micotoxina como fitotoxina, y su producción es predominantemente lograda por *A. alternata*. También el metabolito se asoció con desórdenes hematológicos en humanos. Probablemente tenga la mayor toxicidad de todas las micotoxinas de *Alternaria* (Battilani *et al.* 2009).

AOH, AME y las ATX son producidas principalmente por *A. alternata* y también por otras especies de *Alternaria*, incluyendo *Alternaria tenuissima* (Logrieco *et al.* 2009). En el presente estudio obtuvimos también estos metabolitos en el grupo de especies de *A. arborescens*, presentando los valores mayores tanto en AME como en ATX-I. Las dos primeras han sido reportados como genotóxicos, citotóxicos y cancerígenos y las altertoxinas como mutagénicas (Logrieco *op.cit.*).

TEN es una fitotoxina que afecta a los cloroplastos en ciertas especies de plantas susceptibles (Battilani *et al.* 2009).

Químicamente, el grupo de especies *A. infectoria* es muy diferente de otras especies de *Alternaria*, produciendo metabolitos que no se encuentran en otros grupos de especies. El grupo de especies *A. infectoria* produce infectopironas y novae-zelandinas y no AOH ni TeA (Andersen *et al.* 2009). En el presente estudio el grupo de especies *A. infectoria* produjeron ATX-I, ATX-II y TEN, los cuales no se mencionan en la bibliografía para el grupo *A. infectoria*.

En Argentina, Azcarate *et al.* (2008) estudiaron la ocurrencia de micotoxinas de *Alternaria* en trigo argentino proveniente de la región V Sur durante la cosecha 2004-2005. AOH fue detectado con un rango de 645 a 1.388 µg/kg, AME con un rango de 566 a 7.451 µg/kg de las muestras y TEA con un rango de 1,001 a 8.814 µg/kg. AME fue la toxina predominante, aunque el TeA fue detectado en mayores concentraciones. AOH estaba presente en menor cantidad de muestras y en menores niveles

Patriarca *et al.* (2007) analizaron las micotoxinas AME, TEA y AOH a partir de aislamientos de *Alternaria*. TA fue la toxina producida a mayor concentración pero en menor frecuencia, mientras la obtención de AME y AOH fueron menores. El rango de TA

producido fue de 1 a 14.782 mg/kg, el de AOH fue de 4 a 622 mg/kg y el de AME, 7 a 2.625 mg/kg.

Los valores obtenidos en el presente estudio para las micotoxinas analizadas en común en ambos casos son intermedios entre los hallados por Patriarca *et al.* 2007 y los de Azcarate *et al.* 2008. Los valores medios obtenidos en este estudio fueron 10, 94 mg/kg de AOH, 5,08 mg/kg para AME y en el caso de TeA, 39,81 mg/kg. Azcarate *et al.* (2008) obtienen valores menores que los obtenidos en esta tesis y Patriarca *et al.* (2007) valores altamente mayores.

En relación al aislamiento de la especie grupo *Alternaria infectoria*, produjo ATX-I, ATX- II y TEN. Internacionalmente se ha reportado que las especies grupo de *A. infectoria* producen infectopironas (Larsen *et al.* 2003) y novae-zelandinas. Éstas no han sido detectadas en ninguna otra especie de *Alternaria*, aunque sí se detectaron en otros géneros fúngicos como *Phoma*, *Stemphylium* y *Ulocladium*. Ninguna de las especies del grupo *A. infectoria* produjo alternariol o ácido tenuazónico, que son los comunes en otras especies de *Alternaria* de esporas pequeñas, o alternosolanoles, que son comunes en las especies de *Alternaria* de esporas grandes (Andersen *et al.* 2009). Esta tesis reporta la ocurrencia de altertoxinas I y II y tentoxinas producidas por el grupo de especies *Alternaria infectoria*, lo que podría evidenciar un nuevo perfil metabólico del grupo, al menos en Argentina, que deber ser corroborado con futuros estudios. Este grupo de especies podría ser diferenciado por su perfil metabólico de los grupos de especies de *Alternaria tenuissima*, *A. arborescens* y *A. alternata*.

En relación de los metabolitos secundarios asociados a *Pithomyces chartarum* se obtuvo producción de AOH y AME en pequeñas cantidades. Dada la implicancia de estos compuestos, ya que se ha comprobado su efecto como genotóxicos y citotóxicos, este hallazgo es de gran valor. Además, los estudios realizados en Argentina por Licoff *et al.* (2008) y por di Menna *et al.* (1970, 2009), Kellerman *et al.* (1980), Lima *et al.* (2012), Russomano *et al.* (2003) en otros países, sólo mencionan a la esporidesmina como único metabolito secundario y asociado a daños en ganado.

Muchos investigadores acuerdan en la actualidad en lograr un enfoque polifacético para la caracterización de especies fúngicas (Andersen *et al.* 2009, Da Cruz Cabral *et al.*, 2014, Polizotto *et al.* 2012). La combinación de los métodos morfológicos, moleculares y

químicos es hasta el presente la mejor propuesta hallada para abordar la difícil problemática de la identificación y caracterización de este grupo de hongos.

Capítulo 5
CONCLUSIONES

- ✓ El complejo de especies de *Alternaria* asociado al trigo (grupos de especies *A. arborescens*, *A. tenuissima*, *A. infectoria* y *A. alternata*) se encuentra ampliamente distribuido en las diferentes regiones ecológicas trigueras de Argentina.
- ✓ Los caracteres morfológicos utilizados de manera aislada son insuficientes para una caracterización adecuada y certera de las especies estudiadas de *Alternaria*.
- ✓ Todos los grupos de especies de *Alternaria* estudiados, contienen representantes patógenos que produjeron diversas alteraciones tanto en semilla como en hoja de las plantas de trigo.
- ✓ El grupo de especies *A. infectoria* produjo altertoxina I y II y tentoxina (metabolitos secundarios) no reportados hasta la fecha en la bibliografía específica.
- ✓ *Pithomyces chartarum* es patógeno de trigo y produjo alteraciones en semillas.
- ✓ *Pithomyces chartarum* produjo alternariol y alternariol monometil éter (metabolitos secundarios) iguales a los que produce *Alternaria*, no informados hasta la fecha en la bibliografía específica.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberione, E., Donaire, G., Frascina, J., Salines, J., Bainotti, C., Gómez, D. & Formica, B. 2010. EEA Información Sanitaria de ECR en campo de productores. INTA Marcos Juárez. 23-26 pp
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST; a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, No. 17:3389-3402.
- Anahosur, K.H. 1978. *Alternaria triticina*. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, N° 583. Commonwealth Mycological Institute Ferry Lane, Kew, Surrey, England.
- Andersen, B. & Thrane, U. 1996. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles and cultural characteristics. *Can. J. Microbiol.* 42:685-689.
- Andersen, B., Kroger, E. & Roberts, R.G. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycol. Res.* 105: 291-299.
- Andersen, B., Kroger, E. & Roberts, R.G. 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-group. *Mycol. Res.* 106(2):170-182.
- Andersen, B., Hansen, M.E. & Smedsgaard, J. 2005. Automated and unbiased image analyses as tools in phenotypic classification of small-spored *Alternaria* spp. *Phytopathology* 95(9):1021-1029.
- Andersen, B., Smedsgaard, J., Jorring, I., Dkoubae, P. & Pedersen, L.H. 2006. Real-time quantification of the AM-toxin gene and HPLC quantification of toxigenic metabolites from *Alternaria* species from apples. *International Journal of Food Microbiology* 111:105-111.
- Andersen, B., Sorensen, J.L., Nielsen F.F., van den Ende, B.G. & de Hoog S. 2009. A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. *Fungal Genetics and Biology* 46:642-656.
- Annone, J.G. 2006. Las principales enfermedades del trigo en Argentina: Su importancia relativa en las regiones productoras Norte y Sur. En: *Actas del Congreso A Todo*

- Trigo 2006: Nuevos conocimientos aplicados a la producción. Federación de Centros y Entidades Gremiales de Acopiadores de Cereales. Hotel Sheraton, Mar del Plata, Buenos Aires. 18 y 19 de mayo de 2006. p.53-58.
- Azcarate, M.P., Patriarca, A., Terminiello, L. & Pinto, V.F. 2008. *Alternaria* toxins in wheat during the 2004 to 2005 Argentinean harvest. *Journal of Food Protection* 71(6):1262-1265.
- Battilani, P., Costa, L.G., Dossena, A., Gullino, M.L., Marchelli, R., Galaverna, G., Pietri, A., Dall'Asta, C., Giorni, P., Spadaro, D. & Gualla, A. 2009. *Alternaria* mycotoxins in food and feed. Chapter 3:126-192. In: Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants. Scientific/Technical report submitted to EFSA, 8214 (10).
- Benavidez, M., Patriarca, A., Cabrera, G. & Fernandez Pinto, V. 2011. Perfil de metabolitos secundarios de *Alternaria alternata* y *Alternaria tenuissima* determinado por HPLC-MS. XII Congreso Argentino de Micología. Posadas, Misiones. 15 al 17 de junio.
- Benavidez Rozo, M.E., Patriarca, A., Cabrera, G., Fernández Pinto, V.E. 2014. Determination of the profiles of secondary metabolites characteristic of *Alternaria* strains isolated from tomato. *Rev Iberoam Micol.* 2014 Apr-Jun; 31(2):119-24. doi: 10.1016/j.riam.2013.09.002.
- Bhat, R., Rai, R.V. & Karim, A.A. 2010. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. In: *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Institute of Food Technologists Vol. 9. Pp. 57-81.
- Bhowmik, T.P. 1969. *Alternaria* Seed Infection of Wheat. *Plant Dis. Rep.* 53(1):77-80.
- Broggi, L.E., Gonzalez, H.H.L., Resnik, S.L. & Pacin, A. 2007. *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.* 2007; 24: 47-51.
- Carmona, M. 2005. Manual para el manejo integrado de enfermedades de trigo. II Edición. Buenos Aires, Argentina. ISBN: 987-43-3784-2. 62 pp.
- Carrillo, B.J.; Carcagno, C.; Corbellini, C.N.; Duffy, S.J.; Miquel, J.M.; de Miguel, M.S. 1980. Fotosensibilización por *Pithomyces chartarum* en bovinos en la República Argentina. Primera comunicación. *Revista Investigación Agropecuaria* 15:527-538.

- Chaurasia S., Joshi, A.K., Dhari, R. & Chand R. 1999. Resistance to foliar blight of wheat: a search. *Genetic resources and crop evolution* (46):469-475.
- Choi, Y.W., Hyde, K.D. & Ho, W.H. 1999. Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity* 3:29-38.
- Chou, H.H. & Wu, W.S. 2002. Phylogenetic analysis of internal transcribed spacer regions of the genus *Alternaria*, and the significance of filament-beaked conidia. *Mycol. Res.* 106(2):164-169.
- Christensen, C.H. 1958. Fungi on and in wheat seed. *Cereal Chem.* 28:408-415.
- Christensen, K.B., Van Klink, J.W., Weavers R.T., Larsen, T.O., Andersen B. & Phipps R.K. 2005. Novel chemotaxonomic markers of the *Alternaria infectoria* species-group. *J. Agric. Food. Chem.* 53: 9431-9435.
- Chulze, S.N., Torres, A.M., Dalcero, A.M., Etcheverry, M.G., Ramírez, M.L. & Farnochi, M.C. 1995. *Alternaria* mycotoxins in sunflower seeds: incidence and distribution of toxins in oil and meal. *Journal of Food Protection* 58, 1133-1135.
- Conner, R.L. & Davidson, J.G.N. 1988. Resistance in wheat to black point caused by *Alternaria alternata* and *Cochliobolus sativus*. *Can. J. Plant Sci.* 68:351-359.
- Cordo, C.A. 2014. Patologías del trigo. En Cordo, C.A & Sisterna M.N. (coordinadoras). *Enfermedades del trigo. Avances científicos en la Argentina*. Ed. Edulp. La Plata, Argentina. Pp 21-56.
- Cramer, R.A., La Rota, C.M., Cho, Y., Thon, M., Craven, K.D., Knudson, D.L., Mitchell, T.K. & Lawrence, C.B. 2006. Bioinformatic analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Alternaria brassicicola*-*Brassica oleracea* interaction. *Mol. Plant. Pathol.* 7(2):113-24. doi: 10.1111/j.1364-3703.2006.00324.x.
- Cuadras, C. M. 2014. *Nuevos Métodos de Análisis Multivariante*. Barcelona: CMC Editions, España.
- Versión obtenida el 30/03/2014 <http://www.ub.edu/stat/personal/cuadras/metodos.pdf>
- Da Cruz Cabral, L., Nielsen, K.F., Stenglein, S., Fernandez Pinto, V. & Patriarca, A. 2014. Enfoque polifásico para la identificación de *Alternaria* spp. aisladas de alimentos. XII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos (MICROAL 2014, 12 al 15 de octubre).

- De Hoog, G.S. & Horré, R. 2002. Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory. *Mycoses* Volume 45, Issue 7-8, pp 259-276.
- Dexter, J.E. & Matsuo, R.R. 1982. Effect of smudge and blackpoint, mildewed kernels, and ergot on durum wheat quality. *Cereal Chem.* 59 (1):63-69.
- Di Menna, M., Campbell, J. & Mortimer, P.H. 1970. Sporidesmin production and sporulation in *Pithomyces chartarum*. *Journal of General Microbiology* 61:87-96.
- Di Menna, M.E., Smith, B.L. & Miles, C.O. 2009. A history of facial eczema (pithomyctotoxicosis) research. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 52(4):345-376.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2012. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Draper, S.R. (Ed). 1991. Seed Science and Technology: ISTA rules 1991.
- Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson T.-H. 2007. Compendium of soil fungi. 2nd Ed. IHW-Verlag, Eching. 672 pp.
- Dugan, F.M. & Lupien, L. 2002. Filamentous fungi quiescent in seeds and culm nodes of weedy and forage grass species endemic to the Palouse Region of Washington and Idaho. *Mycopathologia* 156: 31-40.
- Dugan, F.M. & Peever, T.L. 2002. Morphological and cultural differentiation of described species of *Alternaria* from Poaceae. *Mycotaxon* 83:229-264.
- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. 608 pp.
- FAO, 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y las raciones en el año 2003. ISBN 92-5-305162-0. ISSN 1014-2916.
Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499s/y5499s00.htm> (Consultado el 27/10/14)
- Farr, D.F., & Rossman, A.Y. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved August 26, 2014.
<http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>
- Formento, Á.N. 2010. Enfermedades emergentes en cultivo de trigo. *El Quintal*, p.6-7.

- Formento, Á.N., Velazquez, P.D. & Schutt, L. 2013. Informe de cultivos de invierno 2013. Seguimiento y evaluación de enfermedades de importancia y manejo. Informe N°6. A. Cultivo de colza. INTA, EEA Paraná. http://inta.gob.ar/documentos/mancha-negra-en-el-cultivo-de-colza.-cultivos-de-invierno-2013-informe-no-1/at_multi_download/file/INTA-%20Informe%20N%C2%BA%206%20Cultivos%20Invierno%20EEA%20PARAN%C3%81.pdf. (Consultado el 17/10/2015).
- Formento, Á.N., Velazquez, P.D. & Coll, L. 2014. Comportamiento sanitario de cultivares y líneas avanzadas de colza (*Brassica napus*). Año 2014. INTA, EEA Paraná. http://inta.gob.ar/documentos/comportamiento-sanitario-de-cultivares-y-lineas-avanzadas-de-colza-brassica-napus-.ano-2014/at_multi_download/file/INTA-%20Comportamiento%20sanitario%20colza-%20cultivares%20y%20l%C3%ADneas.pdf. (Consultado el 17/10/2015).
- Frisvald, J.C. 1983. A selective and indicative medium for groups of *Penicillium viridicatum* producing different mycotoxins in cereals. *Journal of Applied Bacteriology* 54:409-416.
- Gaetán, S.A. & Madia, M.S. 1998. La mancha negra de la hoja [*Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltsh.] en cultivos de colza canola de Buenos Aires y Santa Fe, Argentina. *Bol. San. Veg. Plagas* 24: 573-580.
- Gannibal, P., Klemsdal, S. & Levitin, M. 2007. AFLP analysis of Russian *A. tenuissima* populations from wheat kernels and other hosts. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:175-182.
- Gannibal, P.B. 2008. *Alternaria spp.* (*A. alternata* [Fr.] Keissler, *A. tenuissima* [Kunze ex Nees et T. Nees: Fries] Wiltshire, *A. infectoria* Simmons, and other). Black Point, Kernel Blight, *Alternaria* Glume Mold of Barley. In: Afonin, A.N., Greene, S.L., Dzyubenko, N.I. & Frolov, A.N. (eds.). *Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. Economic Plants and their Diseases, Pests and Weeds* [Online]. http://www.agroatlas.ru/en/content/diseases/Hordei/Hordei_Alternaria_alternata/. Consultado el 05/02/2015.

- González, H.H.L., Pacin, A., Resnik, S.L. & Martinez, E.J. 1996. Deoxynivalenol and contaminant mycoflora in freshly harvested Argentinian wheat in 1993. *Mycopathologia* 135:129-134.
- Grau, C.R., Radke, V.L. & Gillespie, F.L. 1982. Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis.*66:506-508.
- Hansen, D.E., McCoy, R.D., Hedstrom, O.R., Snyder, S.P. & Ballerstedt, P.B. 1994. Photosensitization associated with exposure to *Pithomyces chartarum* in lambs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 204(10):1668-1671.
- Hernández-Castillo, F.D., Aguirre-Aguirre, A., Lira-Saldivar, R.H., Guerrero-Rodríguez, Gallegos-Morales, E.G. 2006. Bioeficacia de productos orgánicos, biológicos y químicos contra *Alternaria dauci* Kühn y su efecto en el cultivo de zanahoria. *Phyton* 75:91-101.
- Hong, G.S., Cramer, R.A., Lawrence, C.B. & Pryor, B.M. 2005. Alt a1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. *Fungal Genet. Biol.* 42:119-129.
- Hyde, M.B. & Galleymore, H.B. 1951. The sub-epidermal fungi of cereal grains. II. The nature, identity and origin of the mycelium in wheat. *Ann. Appl. Biol.* 38:348-358.
- Index Fungorum. www.indexfungorum.org. Consultado para clasificación taxonómica <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=337066>. Consultado el 08/01/15 para *P. chartarum*. <http://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=7106>. Consultado el 08/01/15 para *Alternaria* spp.
- Joshi, A.K. & Miedaner, T. 2003. Occurrence and host preference of foliar blight pathogens in different growth stages of rye and wheat in southwest Germany. *Journal of Plant Diseases and Protection* 110(4):350-358.
- Kellerman, T.S., Van der Westhuizen, G.C., Coetzer, J.A., Roux, C., Marasas, W.F., Minne, J.A., Bath, G.F. & Basson, P.A. 1980. Photosensitivity in South Africa. II. The experimental production of the ovine hepatogenous photosensitivity disease geeldikkop (*Tribulosis ovis*) by the simultaneous ingestion of *Tribulus terrestris* plants and cultures of *Pithomyces chartarum* containing the mycotoxin sporidesmin. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 47(4):231-261.

- Konstantinova, P., Bonants, P.J.M., Gent-Pelzer M.P.E., Zouwen, P. & Bulk, R. 2002. Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays. *Mycol. Res.* 106: 23-33.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R. & Nehls, I. 2010. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86:1595-1612.
- Lawrence, D.P., Gannibal, P.B., Dugan, F.M. & Pryor, B.M. 2013. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. *Mycologia* 105(3):530-546.
- Lima, F.G., Haraguchi, M., Pfister, J.A. 3, Guimaraes V.Y., Andrade, D.D. F., Ribeiro, C.S., Costa, G.L., Araujo, A.L.L., & Fioravanti, M.C.S. 2012. Weather and Plant Age Affect the Levels of Steroidal Saponin and *Pithomyces chartarum* Spores in *Brachiaria* Grass. *IJPPR* 2:45-53.
- Licoff, N., Khalloub, P. Diab, S., Cantón, G. Odeón, A. & Odriozola, E. 2008. Evaluación toxicológica de *Pithomyces chartarum* en Argentina. *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires)* 89(1):9-12.
- Logrieco, A., Moretti, A. & Solfrizzo, M. 2009. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin J.* 2:129-140.
- Lori, G.A. & Sisterna, M.N. 2014. Patologías causadas por *Fusarium* spp. y *Bipolaris sorokiniana*. En Cordo, C.A & Sisterna M.N. (coordinadoras). *Enfermedades del trigo. Avances científicos en la Argentina.* Ed. Edulp. La Plata, Argentina. pp:123-128.
- Martin, K.J. & Rygiewicz, P.T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiology* 5:28:11. Disponible en [http: www. biomedcentral.com/1471-2180/5/28](http://www.biomedcentral.com/1471-2180/5/28).
- Masková, Z., Tancinová, D., Barborakova, Z., Felsociová, S. & Miroslavá, C. 2012. Comparison of occurrence and toxinogenicity of *Alternaria* spp isolated from samples of conventional and new crossbred wheat of Slovak origin. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 1(4):552-562.
- Mathur S.B. & Cunfer, B.M. 1993. Seed-borne Diseases and Seed health testing of wheat. *Alternaria leaf blight.* Pp. 9-10. Blackpoint. Pp. 13-21. Danish Government Institute

- Seed Pathology for Developing Countries. Copenhagen, Denmark.. 168 pp. ISBN 87-7026-329-9.
- Matia, J., Mandia, A., Mastilovia, J., Mišan, A., Beljkaš, B., Milovanovia, I. 2008. Contaminations of raw materials and food products with mycotoxins in Serbia. Food Processing, Quality and Safety 35(2):65-67.
- Mc Culloch, C.E. & Searle, S.R. 2001. Generalized, Linear, and Mixed Models. New York: John Wiley & Sons, USA. 325 pp.
- Mercado Vergnes, D., Renard, M.-E., Duveiller, E. & Maraite, H. 2006. Identification of *Alternaria* spp on wheat by pathogenicity assays and sequencing. Plant Pathology 55:485-493.
- Miravalles, M., Beaufort, V., Mockel, F. 2008. Susceptibilidad relativa a escudete negro en variedades de trigo para fideos de Argentina. Φyton 77:263-273.
- Moss, M.O. 2008. Fungi, quality and safety issues in fresh fruits and vegetables. Journal of Applied Microbiology 104(5):1239-1243.
- MycoBank. International Mycological Association. 2015. www.mycobank.org. Consultado el 12/01/2015 para clasificación taxonómica de *Alternaria* y *Pithomyces chartarum*.
- Neergaard, P. 1977. Seed Pathology. Vol. I-II. Ed. MacMillan Press. London and Basingstoke. 1189 pp.
- Nema, K.G. 1986. Foliar disease of wheat leaf spot and blights. In: Joshi, S. Singh, D. & Srivastava K. (eds.) Problems and progress of wheat pathology in south Asia. Pp 162-175. New Delhi, Malhotra Publishing House. 401 pp.
- Nowicki, M., Nowakowska, M., Niezgoda, A & Kozik, E.U. 2012. Alternaria Black spot of crucifers: symptoms, importance of disease, and perspectives of resistance breeding. Vegetable Crops Research Bulletin 76:5-19. DOI: 10.2478/v10032-012-0001-6.
- Ostry, V. 2008. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. World Mycotoxin Journal 1:175-188.
- Patriarca, A., Terminiello, L., Azcarate, M.P. & Fernandez Pinto, V. 2006. Producción de micotoxinas por cepas de *Alternaria* aisladas de trigo argentino. III Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos. Buenos Aires, Argentina. 8 al 10 de noviembre.

- Patriarca, A., Azcarate, M.P., Terminiello, L. & Fernandez Pinto, V. 2007. Mycotoxin production by *Alternaria* strains isolated from Argentinian wheat. *International Journal of Food Microbiology* 119:219-222.
- Pavón, M.A., Gonzalez, I., Pegels, N., Martín, R. & García, T. 2010. PCR detection and identification of *Alternaria* species-groups in processed foods based on the genetic marker Alt a1. *Food Control* 21:1745-1756.
- Pavón Moreno, M.Á., González Alonso, I., Martín de Santos, R. & García Lacarra, T. 2012 a. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutr Hosp.* 27(6):1772-1781.
- Pavón, M.A., Luna, A., de la Cruz, S., Gonzalez, I., Martín, R. & García, T. 2012b. PCR-based assay for the detection of *Alternaria* species and correlation with HPLC determination of altenuene, alternariol and alternariol monomethyl ether production in tomato products. *Food Control* 25:45-52.
- Peña, D. 2002. Análisis de datos multivariantes. 1º Ed. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España, S. A. U.
- Perelló, A. 2010a. *Alternaria* leaf blight. In: Compendium of Wheat Diseases and Pests Third Ed.2010. APS.St Paul, Minnesota, USA. 171 pp
- Perelló, A. 2010b. New and emerging fungal pathogens associated with leaf blight symptoms on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Argentina. In: Management of Fungal Plant Pathogens. Arya, A. & Perelló, A. (Eds). CAB International, United Kingdom Chapter 18:231-243.
- Perelló, A.E. 2014. Enfermedades nuevas y emergentes en trigo. En: Cordo, C.A & Sisterna M.N. (coordinadoras). Enfermedades del trigo. Avances científicos en la Argentina. Ed. Edulp. La Plata, Argentina. pp186-200.
- Perelló, A., Cordo, C. & Alippi, H. 1992. Tizón de la Hoja del Trigo (*Triticum aestivum* L) ocasionado por *Alternaria triticina* Pras. & Prab. H. VIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Paraná, Entre Ríos, 7-11 de Septiembre de 1992.
- Perelló, A., Cordo, C. & Simón, M.R. 1996. A new disease of wheat caused by *Alternaria triticimaculans* in Argentina. *Agronomie* 16:107-112.

- Perelló, A.E., Sisterna, M.N. & Moreno, M.V. 2002. Manchas foliares del trigo causadas por el complejo *Alternaria infectoria* en la Argentina. XI Jornadas Fitosanitarias Argentinas, 26-28 junio 2002, Río Cuarto, Córdoba, p 33.
- Perelló, A., Tacaliti, M.S., Moreno, V. & Castro, A. 2003 Análisis comparativo de patrones isoenzimáticos en aislamientos de *Alternaria infectoria* asociados a tizones foliares del trigo. XXIX Jornadas Argentinas de Botánica, San Luis, p. 275.
- Perelló, A., Carranza, M. & Larran, S., 2005a. Patógenos de semillas asociados al manchado del grano de trigo. Actas XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina, p.447.
- Perelló, A.E. & Sisterna, M.N. 2005b. Leaf blight of wheat caused by *Alternaria triticina* in Argentina. New Disease Reports 11,24. (online). www.bspp.org.uk/ndr/july2005/2005-35.asp.
- Perelló, A.E. & Sisterna, M.N. 2006. Leaf blight of wheat caused by *Alternaria triticina* in Argentina. Plant Pathology 55: 303.
- Perelló, A., Moreno, M.V. & Sisterna, M. 2008a. *Alternaria infectoria* species-group associated with black point of wheat in Argentina. Plant Pathology 57:379.
- Perelló, A. & Sisterna, M. 2008b. Formation of *Lewia infectoria*, the teleomorph of *Alternaria infectoria*, on wheat in Argentina. Australasian Plant Pathology. Vol. 37 p. 1. ISSN: 0815-3191.
- Perelló, A. & Larrán, S. 2013. Nature and effect of *Alternaria* sp complex from wheat grain on germination and disease transmission. Pakistan Journal of Botany. Vol. 45 p. 1817. ISSN: 0556-3321.
- Perelló, A., Truol, G., Campos, P., Cordo, C., Formento, N., González, M., Melegari, A., Sagadin, M., Perez, B. & Nome, S. 2013. Enfermedades de *Triticum aestivum* L. subsp. *aestivum* (trigo, trigo pan, trigo hexaploide). En: Atlas Fitopatológico Argentino. Vol. 4, N° 4. Diciembre 2013. Editores Nome, S.F., Docampo, D.M. & Conci, L.R. ISSN 1851-8974. Córdoba, Argentina.
<http://rian.inta.gov.ar/atlas/Inicio.aspx#/ConsultaGeneral?Id=1045>.
 Consultado el 22/11/2014.

- Polizotto, R., Andersen, B., Martini, M., Grisan, G., Assante, G. & Musetti, R. 2012. A polyphasic approach for the characterization of endophytic *Alternaria* strains isolated from grapevines. *Journal of Microbiological Methods* 88:162-171.
- Pryor, B.M. & Gilbertson, R.L. 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycol Res* 104:1312-1321.
- Pryor, B.M. & Bigelow, D.M. 2003. Molecular characterization of *Embellisia* and *Nimbia* species and their relationship to *Alternaria*, *Ullocladium* and *Stemphylium*. *Mycologia* 95:1141-1154.
- Rawson, H.M., Gómez Macpherson, H. 2000. The Zadoks decimal growth stages. Section 2. In: Irrigated wheat. Managing your crop. FAO. ISBN 92-5-104488-0. <http://www.fao.org/docrep/006/x8234s/x8234s05.htm>
- Roberts, R.G., Reymond, S.T. & Andersen, B. 2000. RAPD fragment pattern analysis and morphological segregation of small-spored *Alternaria* species and species groups. *Mycological Research* 104:151-160.
- Romero, S.M., Comerio, R.M., Larumbe, G., Ritieni, A., Vaamonde, G. & Fernández Pinto, V., 2005. Toxigenic fungi isolated from dried vine fruit in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 10443-10449.
- Rotem, J. 1994. The *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 326 pp. ISBN 0-89054-152-3.
- Russomanno, O.M.R., Portugal, M.A.S.C., Coutinho, L.N., Calil, E.M.B. & Figueiredo, M.B. 2003. *Leptosphaerulina chartarum* (= *Pithomyces chartarum*) e seu envolvimento no eczema facial. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.70, n.3, Pp.385-390.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. & Filtenborg, O. (Eds.). 2002. Introduction to Food- and Air Borne Fungi. Sixth ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- SAS Institute Inc. 2009. SAS OnlineDoc® 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc., USA.
- SENASA, 2014. Estadísticas de exportaciones de trigo por destino. <http://www.senasa.gob.ar/estadistica.php>
- Simmons, E.G. 1967. Typification of *Alternaria*, *Stemphylium*, and *Ulocladium*. *Mycology* 59:67-92.

- Simmons, E.G. 1971. *Helminthosporium allii* as type of a new genus. Mycologia 63:380-386.
- Simmons, E.G. 1986. *Alternaria* themes and variations (22.26). Mycotaxon 25(1):287-308.
- Simmons, E.G. 1990. *Alternaria* themes and variations (27.53). Mycotaxon 37:79-119.
- Simmons, E.G. 1992. *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: Chelkowski J. & Visconti A. (eds). *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites*. Amsterdam, Elsevier 1-35.
- Simmons, E.G. 1994. *Alternaria* themes and variations (106-111). Mycotaxon 50:409-427.
- Simmons, E.G. 1995. *Alternaria* themes and variations (112-144). Mycotaxon 55:55-163.
- Simmons, E.G. 2007. *Alternaria: an identification manual*. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands. 775 pp.
- Simmons, E.G. & Roberts, R.G. 1993. *Alternaria* Themes and Variations (73). Mycotaxon 48: 109-140.
- Sinclair, D. P. 1961. *Pithomyces chartarum* spores on pasture and their relation to facial eczema in sheep. New Zealand Journal of Agricultural Research 4:5-6, 492-503, DOI: 10.1080/00288233.1961.1043160.
- Singh, R., Singh, A. & Singh, S.P. 1998. Distribution of pathogens causing foliar blight of wheat in India and Neighboring countries. In: Duveiller, E., Dubin, J. & Reeves, J. 1998. *Helminthosporium* blights of wheat: Spot blotch and Tan spot. México, DF; CIMMYT, 376pp.
- Sisterna, M.N. & Sarandon, S.J. 2005. Preliminary studies on the natural incidence of wheat blackpoint under different nitrogen fertilization levels and tillage systems in Argentina. Plant Pathology Journal 4(1):26-28.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 1962. The Comparison of Dendrograms by Objective Methods. Taxon. Vol. 11, No. 2: 33-40. Article Stable <http://www.jstor.org/stable/1217208>
- Stenglein, S.A & Balatti, P.A. 2006. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentin as revealed by pathogenic and molecular markers. Physiological and Molecular Plant Pathology 68:158-167.
- Strandberg, J.O. 1977. Spore production and dispersal of *Alternaria dauci*. Phytopathology 67:1262-1266.

- Sutton, B.C., Gibson, I.A.S. 1977. *Pithomyces chartarum*. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria (54): Sheet 540.
- Terminiello, L., Patriarca, A., Pose, G. & Pinto, V.F. 2006. Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argentinean tomato puree. *Mycotoxin Research* 22(4):236-240.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* Nov 11, 22(22):4673–4680.
- Tóth, B., Csosz, M., Dijksterhuis, J., Frisvald, J.C. & Varga, J. 2007. *Phitomyces chartarum* as a pathogen of wheat. *Journal of Plant Pathology* 89(3):405-408.
- Vishwanath, V., Sulyok, M., Labuda, R., Bicker, W. & Krska, R. 2009. Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395:1355–1372.
- Wolcan, S.M. 2014. Patologías causadas por *Gaeumannomyces graminis*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp. y otros. En Cordo, C.A & Sisterna M.N. (coordinadoras). *Enfermedades del trigo. Avances científicos en la Argentina*. Ed. Edulp. La Plata, Argentina. pp128-149.
- Xue, F., Zhang, X.G., 2007. *Ulocladium capsicum*, a new species identified by morphological and molecular phylogenetic data. *Sydowia* 59:161-178.
- Yekeler, H., Bitmis, K., Ozcelik, N., Doymaz, M.Z. & Calt, M. 2001. Analysis of toxic effects of *Alternaria* toxins on esophagus of mice by light and electron microscopy. *Toxicologic Pathology* 29(4):492-497.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T. & Konzak, C.F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weeds Res.* 14: 415.
- Zillinsky, F.J. 1983. *Common Diseases of Small Grain Cereals: A Guide to Identification*. CIMMYT. México D. F. México. 141 pp.
- Zur, G., Shimoni, E., Hallerman, E. & Kashi, Y. 2002. Detection of *Alternaria* fungal contamination in cereal grains by a polymerase chain reaction-based assay. *J. Food Prot.* 65:1433-1440.

Apéndice 1

Preparación de medios de cultivo utilizados

Agar papa zanahoria (APZ)

APZ	
Ingrediente	Cantidad
zanahoria	20 g
papa blanca	20 g
agar	20 g
agua destilada	1 l

Cortar la papa y la zanahoria en trozos pequeños. Colocarlos en un recipiente con 100 ml de agua destilada y llevar a ebullición durante 15 minutos. Filtrar a través de muselina ejerciendo presión sobre los vegetales cocidos para permitir el paso de pequeñas cantidades de los mismos. Colectar el líquido y descartar los trozos vegetales que permanecieron en la muselina. Agregar agua destilada hasta alcanzar 1 litro. Añadir el agar y mezclar. Calentar hasta ebullición con agitación. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar papa glucosado (APG)

Según instrucciones del fabricante. Medio de cultivo utilizado: marca Britania. www.britanialab.com.

APG	
Ingrediente	Cantidad
papa deshidratada	4 g
glucosa	20 g
agar	15 g
agua destilada	1 l

Disolver 39 g del polvo en un litro de agua destilada. Dejar reposar 5 minutos. Calentar hasta ebullición con agitación continua. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Diclorán Rosa de bengala sacarosa y extracto de levadura (DRYES)

DRYES	
Ingrediente	Cantidad
Extracto de levadura	20 g
Sacarosa	150 g
Dicloran (0.2% en etanol)	1 ml
Rosa de bengala (5% sc., p/v)	0,5 ml
Cloranfenicol	0,1 g
agar	20 g
agua destilada	1 l

Disolver los ingredientes sólidos en el agua destilada, luego agregar los ingredientes líquidos. Calentar hasta ebullición con agitación. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Agar extracto de levadura sacarosa (YES)

YES	
Ingrediente	Cantidad
Extracto de levadura	20g
Sacarosa	150g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5g
agar	20 g
agua destilada	1 l

Disolver los ingredientes sólidos en el agua destilada. Calentar hasta ebullición con agitación. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Apéndice 2

Protocolo de extracción y purificación de ADN

PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit. Marca: Invitrogen™
Protocolo de Purificación para usuarios experimentados (Se adjunta protocolo original en inglés en la siguiente página).

Fuente: Invitrogen

Introducción

Esta hoja rápida de referencia para el protocolo de purificación de PCR está incluida para usuarios experimentados del PureLink Quick Gel de extracción y el Kit Combo de purificación de PCR. Si es un usuario principiante, siga el protocolo detallado provisto en la página 15 de este manual.

El procedimiento de purificación fue diseñado para purificar hasta 40 µg de ADN doble cadena en un tiempo total de 10-12 minutos usando una microcentrífuga capaz de centrifugar a más de 10.000 g.

Protocolo de Purificación

1. Agregar 4 volúmenes del Buffer de unión (Binding Buffer, B2) a 1 volumen del producto de la PCR (50-100 µl). Mezclar bien.
2. Agregar una muestra del paso 1 a la columna de centrifugado y limpieza Purelink (Purelink Clean-up Spin Column) en un tubo de lavado.
3. Centrifugar la columna a 10.000 g durante 1 minuto. Descartar el líquido resultante.
4. Lavar la columna con 650 µl del buffer de lavado con etanol.
5. Centrifugar la columna a 10.000 g durante 1 minuto. Descartar el líquido resultante.
6. Centrifugar la columna a la velocidad máxima durante 2-3 minutos para remover todo resto de buffer de lavado residual.
7. Colocar la columna en un tubo de elución limpio de 1,7 ml.
8. Agregar 50 µl del Buffer de Elución (E1) en el centro de la columna.
9. Incubar la columna a temperatura ambiente durante 1 minuto.
10. Centrifugar la columna a la velocidad máxima por 1 minuto.
11. El tubo de elución contiene su producto de PCR purificado. Descartar la columna.
12. Almacenar el producto de PCR purificado a -20°C o usarlo para la siguiente aplicación deseada.

PCR Purification Experienced Users Procedure

Introduction

This quick reference sheet for the PCR purification protocol is included for experienced users of the PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit. If you are a first time user, follow the detailed protocol provided in this manual on page 15.

The purification procedure is designed for purifying up to 40 µg dsDNA in a total time of 10–12 minutes using a microcentrifuge capable of centrifuging $>10,000 \times g$.

Purification Procedure	<ol style="list-style-type: none">1. Add 4 volumes of Binding Buffer (B2) to 1 volume of PCR product (50–100 µl). Mix well.2. Add sample from Step 1 to a PureLink™ Clean-up Spin Column in a Wash Tube.3. Centrifuge the column at $10,000 \times g$ for 1 minute. Discard the flow-through.4. Wash the column with 650 µl of Wash Buffer with ethanol.5. Centrifuge the column at $10,000 \times g$ for 1 minute. Discard the flow-through.6. Centrifuge the column at maximum speed for 2–3 minutes to remove any residual Wash Buffer.7. Place the Spin Column into a clean 1.7 ml Elution Tube.8. Add 50 µl Elution Buffer (E1) to the center of the column.9. Incubate the column at room temperature for 1 minute.10. Centrifuge the column at maximum speed for 1 minute.11. The elution tube contains your purified PCR product. Discard the column.12. Store the purified PCR product at -20°C or use PCR product for the desired downstream application.
-------------------------------	---

Apéndice 3

Secuencias nucleotídicas e identificación en Genbank

LOCUS JX454532 627 bp DNA linear PLN 21-SEP-2012

DEFINITION *Lewia infectoria* strain 63 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION JX454532

VERSION JX454532 GI:406367457

KEYWORDS .

SOURCE *Lewia infectoria*

ORGANISM *Lewia infectoria*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Dothideomycetes; Pleosporomycetidae; Pleosporales; Pleosporineae; Pleosporaceae; *Lewia*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 627)

AUTHORS Stenglein,S. and Perello,A.

TITLE *Alternaria* species-groups on wheat in Argentina, identity, pathogenicity and toxins involved

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 627)

AUTHORS Stenglein,S. and Perello,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (01-AUG-2012) BIOLAB-Azul, Facultad de Agronomía-UNCPBA, Avenida Republica de Italia 780, Azul, Buenos Aires 7300, Argentina

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..627

/organism="Lewia infectoria"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="63"

/isolation_source="wheat grain"

/db_xref="taxon:45303"

/country="Argentina"

misc_RNA <1..>627

/note="contains 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA"

BASE COUNT 145 a 166 c 159 g 157 t

ORIGIN

```

1 ggaagtaaaa gtcgtaacaa ggtctccgta ggtgaacctg cggagggatc attacacaat
61 aacaaggcgg getggacacc ccccgctggg cactgcttca cggcgtgcgc ggcggggccg
121 gccctgctga attattcacc cgtgtctttt gcgtacttct tgtttcctgg gtgggctcgc
181 ccgcctcag gaccaaccac aaaccttttg caatagcaat cagcgtcagt aacaacgtaa
241 ttaattacaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctggca tcgatgaaga acgcagcgaa
301 atgcgatacg tagtgtgaat tgcagaattc agtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt
361 gcgccctttg gtattcaaaa gggcatgcct gttcgagcgt catttgtacc ctcaagcttt
421 gcttggtgtt gggcgtcttt tgtctccagt tcgtggaga ctcgccttaa agtcattggc
481 agccggccta ctggtttcgg agcgcagcac aagtcgcgct ctttgccagc caaggtcagc
541 gtccagcaag ccttttttc aacctttgac ctcggatcag gtagggatac ccgctgaact
601 taagcatatc aataagcgga ggcacaa

```

//

LOCUS JX454533 588 bp DNA linear PLN 21-SEP-2012

DEFINITION *Alternaria arborescens* strain 42 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION JX454533

VERSION JX454533 GI:406367458

KEYWORDS.

SOURCE *Alternaria arborescens*

ORGANISM *Alternaria arborescens*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Dothideomycetes; Pleosporomycetidae; Pleosporales; Pleosporineae; Pleosporaceae; mitosporic Pleosporaceae; *Alternaria*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 588)

AUTHORS Stenglein,S. and Perello,A.

TITLE *Alternaria* species-groups on wheat in Argentina, identity, pathogenicity and toxins involved

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 588)

AUTHORS Stenglein,S. and Perello,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (01-AUG-2012) BIOLAB-Azul, Faculatd de Agronomia-UNCPBA, Avenida Republica de Italia 780, Azul, Buenos Aires 7300, Argentina

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..588

/organism="Alternaria arborescens"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="42"

/isolation_source="wheat grain"

/db_xref="taxon:156630"

/country="Argentina"

misc_RNA <1..>588

/note="contains 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA"

BASE COUNT 150 a 135 c 135 g 168 t

ORIGIN

1 tcatagagga agtaaaagtc gtaacaaggt ctccgtaggt gaacctgcgg agggatcatt
 61 acacaaatat gaaggcgggc tggaacctct cgggggttaca gccttgctga attattcacc
 121 cttgtctttt gcgtacttct tgtttccttg gtgggttcgc ccaccactag gacaaacata
 181 aaccttttgt aattgcaatc agcgtcagta acaaattaat aattacaact ttcaacaacg
 241 gatctcttgg ttctggcatc gatgaagaac gcagcgaaat gcgataagta gtgtgaattg
 301 cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa cgcacattgc gcccttttgt attccaaagg
 361 gcatgcctgt tcgagcgtca tttgtaccct caagctttgc ttggtgttgg gcgtcttgc
 421 tctagctttg ctggagactc gccttaaagt aattggcagc cggcctactg gtttcggagc
 481 gcagcacaag tcgcactctc tatcagcaaa ggtctagcat ccattaagcc tttttcaac
 541 ttttgacctc ggatcaggta gggatacccg ctgaacttaa gcatatca

//

LOCUS JX454534 562 bp DNA linea PLN 21-SEP-2012

DEFINITION *Alternaria alternata* strain 29 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION JX454534

VERSION JX454534 GI:406367459

KEYWORDS .

SOURCE *Alternaria alternata*

ORGANISM *Alternaria alternata*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Dothideomycetes; Pleosporomycetidae; Pleosporales; Pleosporineae; Pleosporaceae; mitosporic Pleosporaceae; *Alternaria*; *Alternaria alternata* group.

REFERENCE 1 (bases 1 to 562)

AUTHORS Stenglein,S. and Perello,A.

TITLE *Alternaria* species-groups on wheat in Argentina, identity, pathogenicity and toxins involved

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 562)

AUTHORS Stenglein,S. and Perello,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (01-AUG-2012) BIOLAB-Azul, Faculatd de Agronomia-UNCPBA, Avenida Republica de Italia 780, Azul, Buenos Aires 7300, Argentina

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..562

/organism="Alternaria alternata"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="29"

/isolation_source="wheat grain"

/db_xref="taxon:5599"

/country="Argentina"

misc_RNA <1..>562

/note="contains 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA"

BASE COUNT 140 a 131 c 127 g 164 t

ORIGIN

```

1 tccgtaggtg aacctgcgga gggatcatta cacaatatg aaggcgggct ggaacctctc
.61 ggggttacag ccttgctgaa ttattcacc ttgtctttg cgtacttctt gtttccttgg
121 tgggttcgcc caccactagg acaaacataa accctttgta attgcaatca gcgtcagtaa
181 caaattaata attacaactt tcaacaacgg atctcttggt tctggcatcg atgaagaacg
241 cagegaaatg cgataagtag tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga atctttgaac
301 gcacattgcg ccttttggtg ttccaaaggg catgcctgtt cgagcgtcat ttgtaccctc
361 aagctttgct tgggtgtggg cgtcttgtct ctagctttgc tggagactcg ccttaaagta
421 attggcagcc ggcctactgg ttccggagcg cagcacaagt cgcactctct atcagcaaag
481 gtctagcatc cattaagcct tttttcaac ttttgacctc ggatcaggta gggatacccg
541 ctgaacttaa gcatatcaat aa

```

//

LOCUS JX454535 597 bp DNA linear PLN 21-SEP-2012

DEFINITION *Alternaria tenuissima* strain 33 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION JX454535

VERSION JX454535 GI:406367460

KEYWORDS.

SOURCE *Alternaria tenuissima*

ORGANISM *Alternaria tenuissima*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Dothideomycetes; Pleosporomycetidae; Pleosporales; Pleosporineae; Pleosporaceae; mitosporic Pleosporaceae; *Alternaria*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 597)

AUTHORS Stenglein,S. and Perello,A.

TITLE *Alternaria* species-groups on wheat in Argentina, identity, pathogenicity and toxins involved

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 597)

AUTHORS Stenglein,S. and Perello,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (01-AUG-2012) BIOLAB-Azul, Faculatd de Agronomia-UNCPBA, Avenida Republica de Italia 780, Azul, Buenos Aires 7300, Argentina

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..597

/organism="Alternaria tenuissima"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="33"

/isolation_source="wheat grain"

/db_xref="taxon:119927"

/country="Argentina"

misc_RNA <1..>597

/note="contains 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA"

BASE COUNT 153 a 135 c 139 g 170 t

ORIGIN

```

1 ggaagtaaaa gtcgtaacaa ggtctccgta ggtgaacctg cggagggatc attacacaaa
61 tatgaaggcg ggctggaacc tctcgggggtt acagccttgc tgaattattc acccttgtct
121 ttgcgtact tcttgtttcc ttggtggggtt cgcccaccac taggacaaac ataaaccttt
181 tgtaattgca atcagcgta gtaacaaatt aataattaca actttcaaca acggatctct
241 tggttctggc atcgatgaag aacgcagcga aatgcgataa gtagtgtgaa ttgcagaatt
301 cagtgaatca tcgaatcttt gaacgcacat tgcgcccttt ggtattccaa agggcatgcc
361 tgttcgagcg tcatttgtac cctcaagctt tgcttggtgt tgggcgtctt gtctctagct
421 ttgctggaga ctcgccttaa agtaattggc agccggccta ctggtttcgg agcgcagcac
481 aagtcgcact ctctatcagc aaaggtctag catccattaa gcctttttt caacttttga
541 cctcggatca ggtagggata cccgctgaac ttaagcatat caattaagcg tgaggaa

```


LOCUS JX442978 600 bp DNA linear PLN 08-OCT-2012

DEFINITION *Leptosphaerulina chartarum* strain 17 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION JX442978

VERSION JX442978.1 GI:407912071

KEYWORDS .

SOURCE *Pithomyces chartarum*

ORGANISM *Pithomyces chartarum*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Dothideomycetes; Pleosporomycetidae; Pleosporales; Pleosporineae; Pleosporaceae; *Pithomyces*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 600)

AUTHORS Stenglein,S. and Perello,A.

TITLE *Pithomyces chartarum* causing leaf spot and black point on wheat: first report in Argentina

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 600)

AUTHORS Stenglein,S. and Perello,A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (31-JUL-2012) BIOLAB Azul, Facultad de Agronomia de Azul-UNCPBA, Av Republica de Italia 780, Azul, Buenos Aires 7300, Argentina

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..600 /organism="Pithomyces chartarum"

/mol_type="genomic DNA"

/strain="17"

/db_xref="taxon:1547544" misc_RNA <1..>600

/note="contains 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA"

ORIGIN

```

..1 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attaaccttt caaatcaggg
 61 tgcggcgcgagg cccccgagga gcggaacaa tccttgggag gtatgcgggg gcttcgagcc
121 cccatttac gcacgcacga ctgccatct tactttacga gcacctctg ttccctcg
181 gcggggcaac ctgccgttg aaccgaataa actcttttg catctagcat tacctgttc
241 gaaacaaaca atcggtacaa cttcaacaa tggatctct ggctctggca tcgatgaaga
301 acgcagcgaa atcgataag tagtgtgaat tgcagaattc agtgaatcat cgaatcttg
361 aacgcacatt gcgccctcg gtattccgtg gggcatgcct gtgcagcgt catctacacc
421 ctaagctct gcttggtgtt gggcgtctgt cccgcctcgg cgcgtggact cggccaaat
481 tcattggcag cggctctgc ctctctcgc gcacacatt gcgcttctc aggggctacg
541 gctcgcgtcc aacaagcaca ttaccgtct ttgacctcgg atcaggtagg gataccgct

```

Apéndice 4
Análisis estadísticos complementarios para *Pithomyces chartarum*

Cuadro 1: Test tipo 3 de efectos fijos para semilla germinado (SG)

Tests de tipo 3 de efectos fijos SG				
Efecto	Num DF	Den DF	F- Valor	Pr > F
Cultivar	5	36	6,39	0,0002
Aislamiento	1	36	0,89	0,3511
Cultivar*Aislamiento	5	36	0,62	0,6838

Cuadro 2. Diferencia de medias de mínimos cuadrados para semilla germinada (SG).

Diferencias de medias de mínimos cuadrados SG									
Efecto	Cultivar	Cultivar	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr > t	Ajuste	Adj P
Cultivar	1	3	0,02	0,01636	36	1,22	0,2295	Tukey-Kramer	0,8231
Cultivar	1	5	0,07	0,03649	36	1,92	0,063	Tukey-Kramer	0,4079
Cultivar	1	6	0,1138	0,06795	36	1,67	0,1028	Tukey-Kramer	0,557
Cultivar	1	7	0,0375	0,02079	36	1,8	0,0797	Tukey-Kramer	0,4763
Cultivar	1	9	0,1513	0,0292	36	5,18	<.0001	Tukey-Kramer	0,0001
Cultivar	3	5	0,05	0,03787	36	1,32	0,1951	Tukey-Kramer	0,7721
Cultivar	3	6	0,09375	0,0687	36	1,36	0,1809	Tukey-Kramer	0,7472
Cultivar	3	7	0,0175	0,02314	36	0,76	0,4544	Tukey-Kramer	0,973
Cultivar	3	9	0,1313	0,03091	36	4,25	0,0001	Tukey-Kramer	0,0019
Cultivar	5	6	0,04375	0,07605	36	0,58	0,5687	Tukey-Kramer	0,9921
Cultivar	5	7	-0,0325	0,03999	36	-0,81	0,4217	Tukey-Kramer	0,9633
Cultivar	5	9	0,08125	0,04494	36	1,81	0,0789	Tukey-Kramer	0,4735
Cultivar	6	7	-0,07625	0,06989	36	-1,09	0,2825	Tukey-Kramer	0,8818
Cultivar	6	9	0,0375	0,07284	36	0,51	0,6098	Tukey-Kramer	0,9953
Cultivar	7	9	0,1138	0,03347	36	3,4	0,0017	Tukey-Kramer	0,0191

Cuadro 3. Test tipo 3 de efectos fijos para semilla manchada (SM).

Tests de tipo 3 de efectos fijos SM				
Efecto	Num DF	Den DF	F- Valor	Pr > F
Cultivar	8	54	20,52	<.0001
Aislamiento	1	54	0,33	0,5694
Cultivar*Aislamiento	8	54	3,94	0,001

Cuadro 4. Comparaciones de las dos aislamientos para cada cultivar, variable semilla manchada (SM).

Comparaciones de las dos aislamientos dentro de cada cultivar SM					
Efecto	Cultivar	Num DF	Den DF	F- Valor	Pr > F
Cultivar*Aislamiento	1	1	54	78,82	<.0001
Cultivar*Aislamiento	2	1	54	0,07	0,7881
Cultivar*Aislamiento	3	1	54	0,52	0,474
Cultivar*Aislamiento	4	1	54	6,13	0,0165
Cultivar*Aislamiento	5	1	54	1,32	0,2564
Cultivar*Aislamiento	6	1	54	0,29	0,5932
Cultivar*Aislamiento	7	1	54	0,01	0,9232
Cultivar*Aislamiento	8	1	54	10,95	0,0017
Cultivar*Aislamiento	9	1	54	6,79	0,0118

Cuadro 5. Análisis de varianza para coleoptile necrosado (CN).

Análisis de la varianza CN				
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CN	24	0,51	0,38	120,40

Cuadro 6. Análisis de varianza (SC Tipo III) para coleoptile necrosado.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) CN					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,12	5	0,02	3,77	0,0165
Cultivar	0,03	2	0,02	2,51	0,1089
Aislamiento	0,03	1	0,03	4,83	0,0412
Cultivar*Aislamiento	0,06	2	0,03	4,49	0,0263
Error	0,12	18	0,01		
Total	0,24	23			

Cuadro 7. Análisis de varianza para plántula debilitada (PD).

Variable	Análisis de la varianza			
	N	R ²	R ² Aj	CV
PD	56	0,66	0,56	52,49

Cuadro 8. Análisis de varianza (SC Tipo III) para plántula debilitada (PD).

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III) PD					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,53	13	0,04	6,30	<0,0001
Cultivar	0,42	6	0,07	10,70	<0,0001
Aislamiento	1,1E-03	1	1,1E-03	0,17	0,6803
Cultivar*Aislamiento	0,11	6	0,02	2,92	0,0179
Error	0,27	42	0,01		
Total	0,80	55			

Cuadro 9. Análisis de varianza para plántula debilitada (PD).

Tests de tipo 3 de efectos fijos PD				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Cultivar	6	42	10,7	<.0001
Aislamiento	1	42	0,17	0,6803
Cultivar*Aislamiento	6	42	2,92	0,0179

Cuadro 10. Test de secciones de efecto para plántula debilitada (PD).

Tests de secciones de efecto PD					
Efecto	Cultivar	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Cultivar*Aislamiento	1	1	42	0,19	0,6628
Cultivar*Aislamiento	2	1	42	0,56	0,4595
Cultivar*Aislamiento	3	1	42	3,57	0,0659
Cultivar*Aislamiento	4	1	42	5,21	0,0275
Cultivar*Aislamiento	6	1	42	3,9	0,0547
Cultivar*Aislamiento	7	1	42	0,19	0,6628
Cultivar*Aislamiento	9	1	42	4,08	0,0498